

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

BRUNO MAGELA DE MELO SIQUEIRA

**COLORAÇÃO DE ESPÉCIMES ANATÔMICOS PARA APLICAÇÃO NO
PROCESSO DE PLASTINAÇÃO POR MEIO DE CORANTES
HISTOLÓGICOS: FLOXINA B, SAFRANINA, FUCSINA FENICADA E
TRICRÔMICO DE MASSON**

VITÓRIA
2018

BRUNO MAGELA DE MELO SIQUEIRA

**COLORAÇÃO DE ESPÉCIMES ANATÔMICOS PARA APLICAÇÃO NO
PROCESSO DE PLASTINAÇÃO POR MEIO DE CORANTES
HISTOLÓGICOS: FLOXINA B, SAFRANINA, FUCSINA FENICADA E
TRICRÔMICO DE MASSON**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Athelson Stefanon
Bittencourt

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Ana Paula Santana
de Vasconcellos Bittencourt

VITÓRIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

S618c Siqueira, Bruno Magela de Melo, 1990 -
Coloração de espécimes anatômicos para aplicação no processo de
plastinação por meio de corantes histológicos: floxina b, safranina, fucsina
fenicada e tricrômico de masson / Bruno Magela de Melo Siqueira - 2018.
126 f. : il.

Orientador: Athelson Stefanon Bittencourt.

Coorientador: Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Anatomia. 2. Sistema Musculoesquelético. 3. Corantes. I. Bittencourt ,
Athelson Stefanon. II. Bittencourt, Ana Paula Santana de Vasconcellos.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
IV. Título.

CDU: 61

Elaborado por Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

Bruno Magela de Melo Siqueira

**“Coloração de espécimes anatômicos para aplicação no
processo de plastinação por meio de corantes histológicos:
Floxina B, Safranina, Fucsina Fenicada e Tricrômico de
Masson”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovado(a) em 17 de setembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt – Orientador



Prof.ª Dr.ª Ana Paula Santana Vasconcelos Bittencourt – Coorientadora



Prof. Dr. André Romero da Silva – Examinador Interno



Prof. Dr. Joselito Nardy Ribeiro – Examinador Externo

Vitória/ES
2018

Dedico esta dissertação aos meus pais por me apoiarem em todos os momentos ao longo de minha caminhada e por todo suporte que me foi necessário. A vocês, toda a minha gratidão.

O conhecimento científico é uma ciência que nos permite ampliar a semântica e o aprendizado que temos em relação ao mundo em que somos compostos.

Ketely Temper Almela

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, por me conceder forças de chegar até aqui, por todas as conquistas, pelo amadurecimento que obtive durante esta caminhada e por não me deixar desistir nos momentos em que mais fraquejei.

Aos meus pais **Denir e Rízola**, por me apoiarem em todos os momentos e escolhas que fiz, acreditando no meu potencial e pelo suporte imprescindível. Por me ajudarem com relação à formação de meu caráter e principalmente por todos os conselhos. Em especial, quero agradecer também por se doarem em relação a mim e pelo que sou. Gratidão infinita a vocês.

Pela minha irmã **Thais**, seu marido **Higor** e meus dois sobrinhos **Vinícius e Erick**, pois mesmo estando na parte Norte do país, estão comigo durante esta conquista.

A todos os meus **familiares**, por todos os momentos que acreditaram em mim, mandando mensagens positivas.

Às minhas avós, **Marízia e Maria José**, por estarem ao meu lado mandando forças com palavras de incentivo e orações, mesmo que por telefone, o meu muito obrigado!

Ao meu orientador **Professor Dr. Athelson Stefanon Bittencourt**. Você não faz ideia de como mudei desde quando te conheci e foi para melhor. Muito obrigado por todo suporte emocional, científico e pelos momentos de compreensão. Obrigado pela oportunidade de fazer parte de seu laboratório e por todos os conhecimentos que adquiri ao longo desses dois anos de caminhada. Sendo seu orientando, tive a oportunidade de participar de vários momentos incríveis que nunca imaginei que iria vivenciar e isso foi extremamente gratificante para mim. Obrigado por ser este grande amigo e por saber dizer as palavras certas nas ocasiões onde me encontrava desesperado. Em especial, também quero agradecer por você ter me permitido fazer parte de um grande sonho seu, que foi a inauguração do Museu de Ciências da Vida. Obrigado por todos os ensinamentos, pelo incentivo e por acreditar em mim para o desenvolvimento desta pesquisa. Sou eternamente grato por ser seu aluno.

À **Professora Dra. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt**, por todo apoio durante a realização deste trabalho, pelos ensinamentos para elaborar a

apresentação do Workshop de Plastinação e por toda contribuição das ideias durante as reuniões de discussão do projeto. Muito obrigado!

Agradeço por todo apoio nos momentos difíceis pela Equipe do Museu de Ciências da Vida: **Ana Paula, Eloisa, Rafaela, Letícia Zandonadi, Tháycila e Randriely**. À vocês todas, o meu muito obrigado por tudo. Em especial quero agradecer também ao **Yuri** e a **Laíssa**. Vocês foram e ainda são muito importantes para mim. Não tenho palavras para agradecer o que vocês dois fizeram pela minha pessoa. Muito obrigado mesmo por me ouvirem em todos os momentos e principalmente quando eu falava que não iria conseguir, e vocês em todos os instantes estavam ao meu lado e falando que iria dar certo. Obrigado também pela ajuda nos experimentos e por todo o conhecimento que vocês me transmitiram. Não poderei também de esquecer as nossas risadas durante as viagens e de todo companheirismo ao longo das montagens das exposições. Obrigado por compartilharem comigo todos esses instantes. Só tenho a agradecer pela amizade de toda a Equipe do Museu. A todos vocês ainda estou buscando palavras para agradecer todo o cuidado e pela paciência que tiveram comigo durante esses dois anos. Muito obrigado!

A todos que passaram pela **Equipe de Dissecção do Laboratório de Plastinação**, meu muito obrigado por todo apoio ao longo desta trajetória. Não tem como esquecer o Plastinarock, que afinal já passou da hora de outro acontecer. Em especial quero agradecer a **Letícia Krüger, Felipe, Leidiane, Larissa e Izabella**. Muito obrigado por tudo que vocês fizeram por mim. Não tenho palavras para agradecer vocês.

Aos meus amigos de turma por todo apoio e pela troca de conhecimento, obrigado por todo apoio durante os seminários, provas e pelas nossas comemorações ao longo do Mestrado: **Sarah, Suellen, Fabiano, Luís, Glenda, Ana Maria, Rafael, Lara** e em especial à **Rafaela** (por ter aguentado minhas reclamações, me ouvir com toda paciência e falando que tudo iria dar certo). A todos vocês, o meu muito obrigado.

A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia** por todo apoio e ensinamento que vocês me transmitiram. Obrigado por nos mostrar essa grande vontade de mudar e revolucionar a Ciência em nosso país. Muito obrigado por tudo!

Ao **Biotério Central** do Centro de Ciências da Saúde da UFES, pela doação das carcaças dos animais. Muito obrigado.

Ao **professor Dr. André Romero da Silva**, por todo o suporte e conhecimentos transmitidos durante a análise das soluções e por ceder o seu laboratório para a realização de parte dos experimentos. Sou muito grato por tudo!

A toda equipe do laboratório de Histotécnica da UFES de Maruípe, pelo suporte durante a realização dos cortes dos tecidos, coloração e visualização ao microscópio. Obrigado por cederem os corantes e soluções que foram utilizados para a realização deste trabalho. **Luciene, Viviane e Rafaela**, muito obrigado também pela amizade de vocês.

Ao **professor Dr. André Romero da Silva** e ao **professor Dr. Joselito Nardy Ribeiro**, por aceitarem o convite de avaliar este trabalho e por contribuírem com seus ensinamentos e conhecimentos. Muito obrigado mesmo.

A todos meus **amigos**, que desde a época do Ensino Médio, acompanharam minha caminhada acadêmica.

Aos amigos que fiz na graduação e aos que vivenciaram comigo esta etapa tão importante, **Rafaella Marques, Renann, Natane, Elaine, Tatielle, Rafaella Spilare, Ana Carolina, Mateus, Melina, Taíssa, Tatiane, Pettala e Flávia**.

À **Jéssica Birro e Mariane Vieira**, que tive a satisfação de ter conhecido, mesmo que no final desta etapa, mas que foram de extrema importância para eu continuar seguindo firme e por não desistirem de mim. A vocês duas, o meu muito obrigado.

À **Universidade Federal do Espírito Santo**, pelo aprendizado e crescimento tanto profissional, como no âmbito científico e em especial por todo suporte.

A **CAPES**, pela bolsa de fomento, ao **CNPQ**, e a **FAPES**, pelo recurso financeiro para a realização desta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram de alguma forma. Muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese do Formaldeído	29
Figura 2: Reação de polimerização do Formaldeído	30
Figura 3: Reação do Metanol como estabilizador.....	31
Figura 4: Estrutura Molecular do Tetraetilortosilicato.....	34
Figura 5: Estrutura Molecular do Dibutil estanho dilaurato (DBTL)	34
Figura 6: Espectro Eletromagnético	36
Figura 7: Exemplos de grupamentos cromóforos	39
Figura 8: Transição de elétrons em níveis de energia	41
Figura 9: Diagrama de Jablonski modificado.....	42
Figura 10: Classificação dos corantes de acordo com sua origem.....	45
Figura 11: Estruturas moleculares de corantes aniônicos – à esquerda (Eosina); no meio (Vermelho Congo) e à direita (Sudan IV)	46
Figura 12: Estruturas moleculares de corantes catiônicos – Hematoxilina (à esquerda), Safranina (no meio) e Vermelho Neutro (à direita)	47
Figura 13: Fórmula Molecular do corante Floxina B	48
Figura 14: Estrutura Molecular do grupamento xanteno.....	48
Figura 15: Estrutura Molecular do cromóforo Fenazina.....	49
Figura 16: Estrutura Molecular do corante Safranina	49
Figura 17: Estrutura Molecular do corante Fucsina Básica.....	50
Figura 18: Estrutura Molecular do cromóforo Triarilmetano.....	51
Figura 19: Estrutura Molecular do corante Fucsina Ácida	52
Figura 20: Estrutura Molecular do corante Ponceau de Xilidina.	52
Figura 21: Estrutura Molecular do cromóforo Azo.	53
Figura 22: Estrutura Molecular do corante Orange G.	53
Figura 23: Estrutura do músculo esquelético.....	54
Figura 24: Exemplos de mecanismos de ligações entre corantes e tecidos biológicos.....	56
Figura 25: Início da dissecação; B – Procedimento de Evisceração; C – Carcaça eviscerada; D – Musculatura superficial exposta; E e F – Divisão da Carcaça	69
Figura 26: Desidratação em acetona de espécimes previamente fixados e em contato ou não com os corantes testados (Floxina B, Controle, Fucsina Fenicada, Safranina e Tricrômico de Masson) – da esquerda para direita	70

Figura 27: (A). Acetonômetro (B). Medição da concentração da acetona em proveta por meio do acetonômetro.....	70
Figura 28: Câmera de vácuo contendo as peças submergidas no silicone em seus respectivos recipientes durante a etapa de impregnação forçada	71
Figura 29: Aplicação de catalisador químico DBTL para cura do silicone após a impregnação	72
Figura 30: Grupos experimentais com seus referentes corantes e o controle: (A) – Floxina B; (B) – Safranina; (C) – Fucsina Fenicada; (D) – Tricômico de Masson e (E) – Grupo controle.....	73
Figura 31: Método de retirada das amostras para serem submetidas a análise histológica: (A). Músculo Estriado Esquelético; (B). Pele e (C). Tecido Adiposo	75
Figura 32: Etapa de coloração dos cortes utilizados: (A) – Floxina B; (B) – Tricômico de Masson; (C) – Safranina e (D) – Fucsina Fenicada	77
Figura 33: Espécime plastinado previamente corado com Floxina B.....	81
Figura 34: Comparação entre uma peça plastinada e corada com Floxina B (à esquerda) e uma peça plastinada sem corante (à direita)	82
Figura 35: Tendão (seta azul), Fáscia (seta preta) e Pele (seta laranja) em evidência, mostrando que não foram tingidos pelo corante.....	83
Figura 36: Estrutura Molecular da Eosina evidenciando o íon enolato	84
Figura 37: Corte sagital do músculo corado mostrando o interior não tingido pelo corante (seta).....	84
Figura 38: Espécime plastinado previamente corado com a Safranina	85
Figura 39: Corte Transversal do músculo evidenciando a coloração interna com Safranina (seta branca).....	86
Figura 40: Modos de ligação de moléculas pequenas com o DNA.....	86
Figura 41: Comparativo entre espécimes plastinados, corado com Safranina (esquerda) e sem corante (direita)	87
Figura 42: Peças coradas com Safranina e mostrando em evidências estrutura como: Tecido Conjuntivo (seta amarela) e Tendão (seta azul).....	87
Figura 43: Espécime corado com a Fucsina Fenicada evidenciando a diferença entre fáscia (seta vermelha), tecido muscular (seta cinza) e pele (seta azul) ..	89
Figura 44: Peça em corte sagital pós-coloração e plastinação, mostrando que o tingimento se deu apenas na superfície da peça. Interior não corado.....	90

Figura 45: Comparação entre uma peça plastinada e corada com Fucsina Fenicada (à esquerda) e uma peça plastinada sem corante (à direita)	91
Figura 46: Espécime plastinado previamente corado com a solução de Tricrômico de Masson, evidenciando a diferença entre músculo e fáscia (seta verde).....	92
Figura 47: Comparação entre um espécime plastinado previamente corado com Tricrômico de Masson (à esquerda) e um espécime plastinado sem corante (à direita).....	93
Figura 48: Corte sagital do músculo esquelético evidenciando a coloração interna com Tricrômico de Masson	94
Figura 49: Imagens de microscopia óptica das amostras de tecidos de rato wistar sem a presença de corantes (espessura de 5 µm): Músculo Esquelético (A) ; Pele (B) e de Gordura (C)	95
Figura 50: Imagens de microscopia óptica das amostras de gordura, coradas com Floxina B (A) ; Safranina (B) ; Fucsina Fenicada (C) e Tricrômico de Masson (D) , em cortes com espessura de 5 µm	96
Figura 51: Imagens de microscopia óptica das amostras de tecido muscular esquelético, coradas com Floxina B (A) ; Safranina (B) ; Fucsina Fenicada (C) e Tricrômico de Masson (D) , em cortes com espessura de 5 µm.....	97
Figura 52: Imagens de microscopia óptica das amostras de tecido epitelial, coradas com Floxina B (A) ; Safranina (B) ; Fucsina Fenicada (C) e Tricrômico de Masson (D) , em cortes com espessura de 5 µm. (setas azuis indicando núcleo e amarelas o citoplasma)	98
Figura 53: Soluções de onde foram retiradas as alíquotas que foram analisadas no espectrofotômetro: Floxina B, Fucsina Fenicada e Safranina, respectivamente.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Faixas associadas aos comprimentos de onda no visível	37
Tabela2: Parâmetros de saturação, concentração e percentuais dos respectivos corantes utilizados	74
Tabela 3: Esquema de coloração das amostras para realização da análise histológica	77
Tabela 4: Vantagens e desvantagens dos corantes utilizados na pesquisa para a coloração dos espécimes	94

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esquema de cores complementares no disco	38
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Espectro de absorção UV-VIS do corante Safranina 5×10^{-6} mol/L em água de torneira.....	101
Gráfico 2: Espectro de absorção UV-VIS do corante Floxina B 5×10^{-6} mol/L em água de torneira.....	102
Gráfico 3: Espectro de fluorescência da Floxina B (5×10^{-6} mol/L) em água de torneira.....	102
Gráfico 4: Espectro de absorção UV-VIS do corante Fucsina Fenicada 5×10^{-6} mol/L em água de torneira	103
Gráfico 5: Espectros de absorção UV-VIS da Floxina B de concentração 5×10^{-6} mol/L antes e depois da solução ser exposta à luz pelo período de 216 horas (9 dias).....	105
Gráfico 6: Espectros de fluorescência da Floxina B de concentração 5×10^{-6} mol/L antes e depois da solução ser exposta à luz pelo período de 216 horas (9 dias).....	105
Gráfico 7: Espectros de absorção UV-VIS da Safranina de concentração 5×10^{-6} mol/L antes e depois da solução ser exposta à luz pelo período de 216 horas (9 dias).....	106
Gráfico 8: Espectros de absorção UV-VIS da Fucsina Fenicada de concentração 5×10^{-6} mol/L antes e depois da solução ser exposta à luz pelo período de 216 horas (9 dias).....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: Porcento

°C: Grau Celsius

pH: Potencial Hidrogeniônico

mm: Milímetros

UV: Ultra Violeta

nm: Nanômetro

σ : Sigma

π : Pi

ΔE : variação de energia

h: Constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{J.s}$)

c: velocidade da luz no vácuo

λ : comprimento de onda.

HOMO: Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia

LUMO: Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia

Ligação de Hidrogênio: H

Carga Líquida: Z

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

IFES: Instituto Federal do Espírito Santo

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPES: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo

mmHg: Milímetros de Mercúrio

DBTL: Dibutil estanho dilaurato

mL: Mililitro

(m/v): Massa por Volume

mol/L: Mol por Litro (concentração)

μm: Micrometro

DPX: p-xylene-bis-N-pyridiniumbromide

UV-VIS: Ultra Violeta - Visível

W: Watts

cm: Centímetros

π^*_{C-N} : Transição Eletrônica do tipo π^* entre Carbono e Nitrogênio do anel fenílico

$\lambda_{\text{máx}} \approx$: Comprimento de onda máximo aproximado

IARC: Agência Internacional de Pesquisa do Câncer

OMS: Organização Mundial da Saúde

HI: Índice de Hidrofobicidade

S_0 : Estado fundamental

S_n : Estado excitado singleto

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

Fispq: Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos

RESUMO

O Estudo da Anatomia é conhecido há vários séculos e diante disso, a cada momento gerou várias repercussões nesta área das ciências biomédicas. Mesmo com o avanço nos setores tecnológicos, o ensino de conceitos anatômicos através de cadáveres nos cursos da saúde, ainda é essencial. Uma maneira mais comumente de se preservar peças anatômicas para estudos, é através de uma substância que foi descoberta em 1867 pelo alemão Hoffman por acidente: o formol, porém tal substância tem odor desagradável e irrita as vias nasais e a região dos olhos. A Plastinação é o que se tem de mais novo em se tratando de tecnologia para preservação de espécimes anatômicos. Tal técnica foi desenvolvida pelo alemão Dr. von Hagens em 1977 e seus princípios refletem na ideia de fazer a impregnação de polímeros (silicone, epóxi ou poliéster) nos tecidos biológicos, retirando a gordura e a água ali presente, aumentando assim a sua durabilidade e com aspectos próximos do objeto original. A Plastinação é isenta de substâncias conservadoras tóxicas, facilitando assim seu papel para fins didáticos e científicos. Utiliza-se o corante para uma melhor visualização das estruturas na peça anatômica e acabando assim com aquele aspecto de desgastado, ressaltando a cor verdadeira do objeto. Diante do exposto, desenvolveu-se um protocolo de coloração em tecido muscular esquelético, aplicado à técnica de Plastinação com os seguintes corantes: Floxina B, Safranina, Fucsina Fenicada e Tricrômico de Masson. Foi avaliada a interação do corante com o tecido muscular esquelético, gordura e tecido epitelial das amostras que foram utilizadas para a realização da pesquisa. Todos os corantes utilizados na coloração das peças macroscópicas conseguiram evidenciar certas estruturas como tendão, fáscia e tecido conjuntivo no interior do músculo. Também foi avaliada a fotodegradação destes corantes em solução. Foi percebido que os corantes que obtiveram resultados mais satisfatórios em relação ao tingimento dos espécimes foram os de caráter aniônico: Floxina B e Tricrômico de Masson, mas em relação à resistência dos corantes em exposição à luz, não foi possível eleger o que obteve o melhor desempenho, pois houve comportamentos diferentes das soluções quando expostas à luz. O protocolo final para coloração de tecidos musculares será aplicado no acervo do Museu de

Ciências da Vida da Universidade Federal do Espírito Santo e no Departamento de Morfologia da mesma Universidade.

Palavras-chave: Anatomia, Tecido Muscular Esquelético, Plastinação, Corantes.

ABSTRACT

The Study of Anatomy has been known for several centuries and before this, every moment has generated several repercussions in this area of biomedical sciences. Even with advancement in the technological sectors, the teaching of anatomical concepts through corpses in health courses is still essential. A more common way of preserving anatomical parts for studies is through a substance that was discovered in 1867 by German Hoffman by accident: formaldehyde, but such substance has an unpleasant odor and irritates the nasal passages and the eye region. Plastination is the newest in terms of technology for the preservation of anatomical specimens. This technique was developed by the German Dr. von Hagens in 1977 and its principles reflect in the idea of impregnating polymers (silicone, epoxy or polyester) in biological tissues, removing the fat and water present, thus increasing their durability and with aspects close to the original object. Plastination is free from toxic conservative substances, thus facilitating its role for didactic and scientific purposes. The dye is used for a better visualization of the structures in the anatomical part and thus ending with that aspect of worn, emphasizing the true color of the object. In view of the above, has developed a staining protocol in skeletal muscle tissue, applied to the Plastination technique with the following dyes: Phloxine B, Safranin, Phenicated Fuchsin and Masson's Trichrome. The interaction of the dye with the muscle tissue, fat and epithelial tissue of the samples that were used for the research was evaluated. All the dyes used in the macroscopic staining were able to show certain structures such as tendon, fascia and connective tissue inside the muscle. It was also evaluated the photodegradation of these dyes in solution. It was noticed that the dyes that obtained more satisfactory results in relation to the dyeing of the specimens were those of anionic character: Phloxine B and Masson's Trichrome, but in relation to the resistance of the dyes in light exposure, it was not possible to choose the one that obtained the best because the solutions exhibited different behaviors when exposed to light. The final protocol for the staining muscle tissues will be applied in the collection of the Life Sciences Museum of the Federal University of Espírito Santo and in the Department of Morphology of the same University.

Keywords: Anatomy, Skeletal Muscle Tissue, Plastination, Dyes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS / LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1. MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE PEÇAS ANATÔMICAS	28
2.1.1. Soluções Fixadoras	28
2.1.2. Formol	30
2.1.3. Plastinação	34
2.2. COR	36
2.2.1. A Química das Cores	39
2.3. COLORANTES	43
2.3.1. Corantes	44
2.3.1.1. Corantes ácidos	46
2.3.1.2. Corantes básicos	47
2.3.2. Floxina B	48
2.3.3. Safranina	50
2.3.4. Fucsina Fenicada (Carbolfucsina)	51
2.3.5. Tricrômico de Masson	53
2.4. TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO	55
2.5. COLORAÇÃO DE TECIDOS BIOLÓGICOS	56
2.6. AÇÕES DE DEGRADAÇÃO DOS COLORANTES	58
3. JUSTIFICATIVA	61

4. OBJETIVOS	66
4.1. OBJETIVO GERAL	66
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	66
5. MATERIAIS E MÉTODOS	68
5.1. ANIMAIS	69
5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	69
5.2.1. Etapas da Plastinação	70
5.2.1.1. Fixação	70
5.2.1.2. Desidratação	71
5.2.1.3. Impregnação Forçada	72
5.2.1.4. Catalisação (Cura)	72
5.2.2. Grupos Experimentais para coloração	73
5.2.3. Análise Histológica	76
5.2.4. Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-VIS	79
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
6.1. ESPÉCIMES CORADOS	82
6.1.1. Espécimes corados com Floxina B	82
6.1.2. Espécimes corados com Safranina	86
6.1.3. Espécimes corados com Fucsina Fenicada (Carbolfucsina)	89
6.1.4. Espécimes corados com Tricrômico de Masson	92
6.2. ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS TECIDOS CORADOS	95
6.3. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ABSORÇÃO MOLECULAR UV-VIS DOS CORANTES UTILIZADOS	100
6.4. DEGRADAÇÃO DOS CORANTES	105
7. CONCLUSÃO	109
8. PERSPECTIVAS DA PESQUISA	111
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Estudo da Anatomia é um dos mais antigos conhecimentos aplicados na área da saúde. Documentos mencionando conhecimentos anatômicos foram encontrados no antigo Egito por volta de 1552 a.C. (SOUZA, 2011), porém, dados e fatos pré-históricos registrados em desenhos rupestres (datados de 250 mil anos atrás) evidenciaram a existência de pequenos entendimentos da ciência anatômica (TALAMONI, 2014, p. 23; PESSIS, 2002).

Por volta do século XVII, a dissecação humana se tornou uma atividade importante nas escolas de medicina e em 1832, na Inglaterra, foi aprovado o “Anatomy Act”, que legalizou a utilização de cadáveres em escolas de medicina na Europa (AJITA e SINGH, 2007; KNOTT, 1985). Essa Legalização se fez necessária para obter um avanço nos estudos da área da saúde e em especial na Medicina, pois se tem como objeto de estudo nesse campo, material cadavérico (QUEIROZ, 2005).

Pela utilização de cadáveres, o estudo da anatomia é totalmente dependente de métodos que tem por função conservar e proteger os tecidos biológicos da ação de micro-organismos, evitando assim a putrefação dos mesmos. De todos os métodos utilizados para tal finalidade, o mais divulgado e empregado é a fixação com o formaldeído, que foi descoberto acidentalmente pelo químico alemão August Wilhelm von Hoffman em 1868, porém o formol começou a ser utilizado para este propósito a partir de 1883, quando Ferdinand Blum testou a utilização de uma solução de formaldeído 40% como fixador em um camundongo e obteve resultado satisfatório (FOX *et al.*, 1985; BEDINO, 2003).

Com o passar do tempo, vários estudos comprovaram a toxicidade do formol (SANTOS, 2004; LADEIRA, 2009; ALVES e ACIOLE, 2012), e já foram fundamentadas suas propriedades nocivas aos seres humanos e animais (FORNAZIERO e GIL, 2003; ALVES e ACIOLE, 2012).

Hamazaki e colaboradores (1993) definiram a fixação em formol como um passo fundamental no processo de conservação de cadáveres. Contudo, conservar as peças anatômicas em formol com a finalidade de utilizá-la nas aulas

práticas de anatomia, tem como resultado uma série de problemas graves à saúde e ao meio ambiente, tendo em visto que a grande maioria das Universidades de nosso país utiliza o formol como principal método de fixação.

Várias pesquisas foram realizadas com o objetivo de amenizar estes problemas relacionados a métodos de conservação de espécimes anatômicos, então por volta de 1977, um médico alemão chamado Gunter von Hagens criou um método chamado de Plastinação, que é a técnica mais avançada de conservação de espécimes anatômicos. Este método consiste em retirar todos os fluídos corporais (água e gordura), para substituir por uma resina (VON HAGENS et al., 1987).

Neste processo, logo após a dissecação de um espécime, este passará pelo processo de plastinação, que consiste nas seguintes etapas: **Fixação** (é um processo químico pelo qual, tecidos biológicos são preservados da decomposição por meio da estabilização de macromoléculas dos tecidos, criando ligações cruzadas entre as proteínas). Caso a peça ainda não tenha sido previamente fixada, esta etapa pode ser realizada por meio da utilização de fixadores convencionais, como solução de formaldeído; **Desidratação** (etapa em que toda a água e parte da gordura do espécime são substituídas por acetona); seguido pelo processo de **Impregnação Forçada**, onde a acetona (solvente orgânico) é substituída por um polímero (epóxi, poliéster ou silicone) em ambiente de baixa pressão, para então proceder-se à última etapa; **Cura**, onde o espécime é submetido a um meio de catálise, que dependendo do polímero utilizado pode ser físico (luz, calor) ou químico. Então, em síntese, a água e a gordura são substituídas pelo polímero (VON HAGENS et al., 1987).

Após a plastinação de um espécime ter sido concluída, é comum que os tecidos biológicos percam a sua cor natural. Ao longo das etapas de fixação e desidratação, os mesmos apresentam uma tendência de escurecimento (pois tecidos ricos em sangue, que são fixados em formaldeído com excesso de ácido fórmico, sofrem escurecimento), devido a este problema, os próprios tecidos se tornam indistinguíveis uns dos outros e de estruturas mais próximas (como músculo e tecido conjuntivo) (McCREARY, 2013). Realizar a coloração de espécimes é conseguir resgatar a aparência real do que era antes, além de facilitar na diferenciação das estruturas dos tecidos. Ao corar espécimes

anatômicos, as cores fornecem uma espécie de modelos visuais que aprimoram o aprendizado da anatomia, assim os estudantes e profissionais da área conseguem visualizar e distinguir melhor padrões anatômicos específicos (RAOOF, 2013).

Com a técnica de preservação de espécimes anatômicos por meio da plastinação, além de se dispensar o uso de soluções conservantes tóxicas de odor desagradável, como o formaldeído, o processo aumenta imensamente a durabilidade das peças, inclusive para o manuseio, o que é extremamente útil para as atividades educativas em anatomia, sejam elas no ambiente acadêmico ou não (HENRY et al, 2007).

Perante o que foi relatado, e considerando pouca disponibilidade, na literatura, de informação sobre coloração em plastinação, o presente trabalho buscou encontrar substâncias colorantes para que, aplicadas à técnica da plastinação, produzam espécimes de aparência mais atrativa e natural, em especial no que se refere à coloração do tecido muscular.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE PEÇAS ANATÔMICAS

2.1.1. Soluções Fixadoras

Em virtude do uso de material cadavérico e sua natural tendência à putrefação, o estudo de anatomia necessita de técnicas de conservação e estabilização de tecidos biológicos e corpos. As soluções fixadoras são compostas por substâncias químicas que mantêm a integridade dos tecidos após a morte. Existem informes de experiências de preservação de cadáveres com outras substâncias, como a Solução de Larssen, modificada para utilização em aulas de técnica operatória, a glicerina, o álcool, o fenol, e dentre outros, mas nenhuma delas com as vantagens características de fixação do formol (SILVA e colab., 2003).

A solução de Larssen tem como componentes químicos o Hidrato de cloral, Sulfato de sódio, Bicarbonato de Sódio, Cloreto de Sódio e Formol, diluídos em água destilada (SAMPAIO, 1992). Na solução de Larssen modificada foram feitos pequenos ajustes nas quantidades dos sais e do formol, com aumento na concentração final destes, mas a alteração significativa à formulação foi à adição de glicerina líquida. O sulfato de sódio e o hidrato de cloral agem na dissolução de coágulos, viabilizando uma ampla remoção de sangue do cadáver (SILVA *et al.*, 2004).

O formol faz a fixação dos tecidos e impede a proliferação de micro-organismos (SILVA e colab., 2003). O sulfato de sódio, adicionalmente, auxilia na preservação da cor natural dos órgãos e tecidos (SILVA *et al.*, 2004). A fixação cadavérica com essa solução resulta em tecidos com coloração, textura e flexibilidade próximas ao natural (SILVA *et al.*, 2003).

Cadáveres conservados com a técnica de fixação pela solução de Larssen mantêm coloração e textura do tecido, semelhantes àsquelas observadas in vivo e mostram-se livres de odores desagradáveis advindos dos componentes químicos usadas na técnica de preservação ou de processo de putrefação (SILVA *et al.*, 2007).

De acordo com Tavano (2009), a utilização da glicerina por Karl Schelle, em 1779, representou um grande impulso na preparação de peças anatômicas, sendo aplicada por Giacomini e por Laskowski na conservação de cadáveres dos anfiteatros de Anatomia. A glicerina é um líquido claro, incolor, viscoso, com capacidade de desidratar as estruturas, a qual se atribui a sua ação antisséptica. A desidratação obtida com a glicerina não altera a concentração iônica das células, o que mantém a integridade celular. Isso traz como vantagens a redução da antigenicidade dos tecidos conservados, facilidade no seu manuseio, e a possibilidade de manutenção das peças em ambiente seco.

A glicerina proporciona uma boa preservação das peças anatômicas com diversas vantagens: as peças se tornam mais leves, a estrutura dos tecidos é preservada o mais próximo do natural e a coloração é satisfatória, o que facilita a identificação das estruturas anatômicas mais difíceis de visualizar. Além disso, a glicerina é uma substância não irritante, atóxica e não possui um risco de contaminação ambiental tão severo quando comparado ao formol (An *et al.* 2012).

Segundo Rodrigues (2005), o álcool etílico tem baixa eficácia de fixação, mas é um ótimo conservador de peças anatômicas. É de fácil obtenção e relativamente barato. Utiliza-se a concentração de 70% para fixação de órgãos em geral, já que acima desse valor as peças tornam-se muito rígidas. Suas principais desvantagens são o clareamento excessivo e a retração dos tecidos. Além disso, por se tratar de uma substância inflamável, sua manipulação e armazenamento requerem cuidados especiais.

O fenol, em forma líquida ou de cristais, também pode ser utilizado como fixador de tecidos biológicos. Entretanto, a sua alta toxicidade (maior que a do formol) faz com que ele seja pouco utilizado nos laboratórios de anatomia. O fenol não endurece os tecidos e torna o meio estéril, inibindo o crescimento de fungos e bactérias. Não tem uma boa miscibilidade em água, mas a adição de álcool etílico à solução permite a combinação dessas substâncias (RODRIGUES, 2005).

Destas soluções, a solução mais difundida no mundo é a fixação com

aldeído fórmico (formaldeído, formalina ou formol), descoberto por acaso em 1867 pelo químico alemão Hoffmann (HADER *et al.*, 1952).

O crédito pela descoberta e pela primeira síntese do formaldeído geralmente vai para Hoffmann, que passou o metanol e vapor sobre um fio de platina quente, no entanto, existe também uma referência à Buterov em 1859, descobrindo o formaldeído pela tentativa de síntese de metilenoglicol. De qualquer forma, o formaldeído foi relativamente tardio em isolamento e síntese comparado aos aldeídos análogos (acetaldeído, etc.) já que a maioria das tentativas falhou devido à rápida oxidação ao ácido fórmico e aos subprodutos da reação: ($\text{HCO}_2\text{H} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Um processo industrial foi introduzido por volta de 1889, onde o formaldeído foi produzido na água, tornando-o assim uma substância química de interesse. A moderna síntese industrial de formaldeído é baseada na oxidação do metanol (**Figura 1**) sobre um catalisador de metal (geralmente prata) com calor (BEDINO, 2003).



Figura 1 – Síntese do Formaldeído.
Fonte: (BEDINO, 2003).

2.1.2. Formol

Tokuda *et al.* (1990) descreveram que o formaldeído é em sua grande maioria utilizado em solução aquosa em concentração de 37% e contém metanol como preservativo para impedir a polimerização. Nessa forma de apresentação mostra-se como líquido incolor, possui massa molar de 30.03 g/mol, ponto de ebulição de -19,5°C e ponto de fusão de -92°C. Apresenta incompatibilidade com oxidantes fortes, álcalis, ácidos, fenóis e ureia. Quando na concentração de 37-40% dissolvido em água passa a se chamar formalina ou formol.

Greer *et al.* (1991) mencionaram que à temperatura ambiente, o aldeído fórmico se apresenta na forma de um gás incolor e de cheiro muito intenso. A solução aquosa de aldeído fórmico, forma disponível comercialmente, é muito consumida nas indústrias de madeira, plásticos e vernizes.

Consoante à escrita deste mesmo autor, o fixador de tecidos biológicos mais utilizado é o formol a 10%, devido ao seu baixo custo e simplicidade de uso. O formol é extremamente volátil e provoca irritação dos olhos e vias respiratórias. Quando apresentado em solução aquosa, o mesmo se precipita em concentrações superiores a 40%, portanto, recebendo esta solução a denominação de "formol puro".

Na verdade, quando o formaldeído está em meio aquoso, o aldeído presente na solução, é encontrado em baixíssimas quantidades. 99,9% das moléculas existentes de formalina na solução é encontrada como metilenoglicol e seus vários polímeros. Formalinas são de natureza ácida e prontamente formam polímeros de vários comprimentos. Quando o metanal está na condição de formalina (formol em solução aquosa), acontece o processo de hidratação de sua molécula e com isso a formação de metilenoglicol, sendo esta substância responsável pelo poder de fixação da formalina. Como o meio desta solução está ácido, acaba favorecendo a polimerização do metilenoglicol (**Figura 2**) e por isso é feito o tamponamento da solução fixante (BEDINO, 2003).

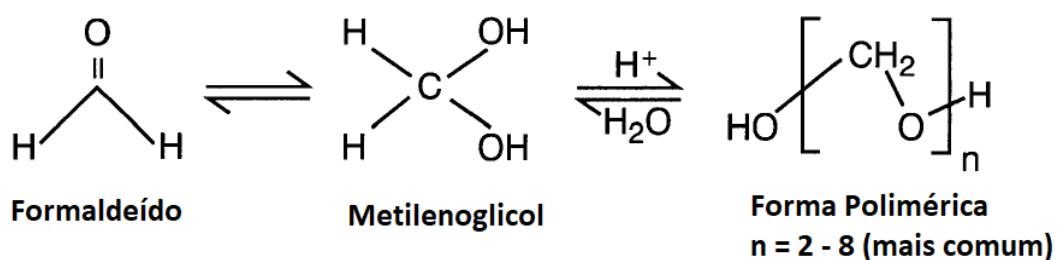


Figura 2 – Reação de polimerização do Formaldeído.
Fonte: (BEDINO, 2003).

Bedino (2003) ainda ressalta que os polímeros de $n = 2$ a 8 são geralmente referidos como paraformaldeídos que existem como um sólido branco que funde a alta temperatura para originar gás formaldeído. As soluções de formalina são instáveis e se degradam se não forem estabilizadas.

Bedino (2003) ainda ressalta que o estabilizador (**Figura 3**) mais popular é o metanol, normalmente em 3-8% em solução. O metanol forma rapidamente um composto chamado metilal com formaldeído em água e é fortemente

favorecido como produto de reação. A estabilização resulta de uma inibição de reação e adição cruzada às formas poliméricas. Por estabilização, até 30% de uma formalina pode existir como o monohidrato de metilenoglicol. É possível utilizar outros estabilizadores como o etanol ou até glicóis ou glicerina. O metanol é escolhido devido à sua disponibilidade e é um subproduto natural da fabricação de formalinas.

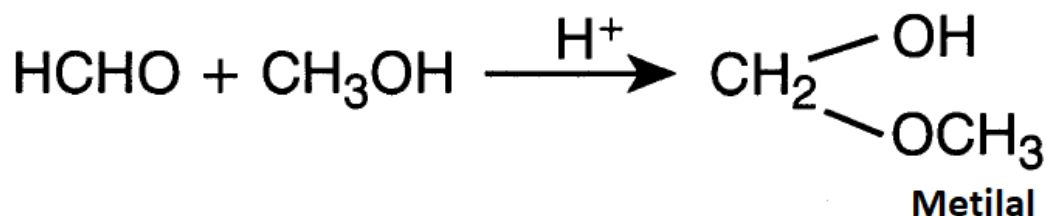


Figura 3 – Reação do Metanol como estabilizador.
Fonte: (BEDINO, 2003).

O formol fixa os tecidos biológicos, por meio da estabilização de macromoléculas: proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, uma vez que forma pontes cruzadas de metileno entre os monômeros naturais presentes nos tecidos biológicos (BEDINO, 2003).

A solução de formalina tem uma tendência natural a ser oxidada, produzindo ácido fórmico. Esse processo de oxidação ocorre prontamente na presença de oxigênio atmosférico e luz, mas uma quantidade desconhecida de ácido fórmico pode estar presente no formaldeído comercial como resultado do armazenamento ou do processo de fabricação. Um problema em relação à produção deste ácido é formação do "pigmento de formalina". Quando tecidos ricos em sangue são fixados em soluções de formaldeído com um excesso de ácido fórmico, um pigmento birrefringente finamente dividido precipita no tecido. Este pigmento é provavelmente um derivado da hematina, que é formado quando o pH (potencial hidrogeniônico) da solução fixadora está abaixo de 6,0, tonando-se uma problemática, pois resulta no escurecimento do tecido biológico do espécime e distorcendo a cor original (FOX *et al.*, 1985).

O formol é um produto com grande importância em diversas áreas. Em se tratando de Ensino de Ciências Médicas, apresenta importante aplicação nas disciplinas de anatomia, histologia e patologia, sendo extensamente usado para

preservar espécimes anatômicos e tecidos biológicos, impedindo a proliferação de micro-organismos e a deterioração das amostras (IARC, 2006).

Vários estudiosos relatam que a utilização do formol em materiais anatômicos, foi um passo importante no processo de conservação. No entanto, manter as peças anatômicas em formol para utilizá-las em aulas práticas, tem como consequências uma série de problemas importantes de saúde e meio ambiente para o país, dado que a grande maioria das Universidades brasileiras tem a formolização como principal método de conservação de espécimes cadavéricos, enquanto que em muitos outros países, como os Estados Unidos da América, a utilização deste produto foi reduzida ao mínimo possível (OLIVEIRA e ZAIAT, 2005; ALVES e ACIOLE, 2012).

Os danos ambientais são provenientes da destinação final inadequada dos resíduos do formol. Estes, quando liberados ao ambiente, devem ser feitos em concentrações muito pequenas, para evitar sobrecargas e reduzir seus efeitos; no caso desta substância atingir um sistema de tratamento de águas residuais, poderá comprometer a biomassa por seu poder bactericida (OLIVEIRA & ZAIAT, 2005).

Estudos demonstram a toxicidade do formol (SANTOS, 2004; LADEIRA, 2009; ALVES e ACIOLE, 2012), e já foram comprovadas suas propriedades irritativas e nocivas a animais e aos seres humanos (FORNAZIERO e GIL, 2003; ALVES e ACIOLE, 2012). Além disso, em 2004 a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou o formaldeído como agente carcinogênico, teratogênico e mutagênico (IARC, 2006).

Nas últimas quatro décadas, pesquisadores estudaram técnicas para o aperfeiçoamento da preservação de cadáveres, e a plastinação representa o que há de mais avançado em métodos de conservação de espécimes anatômicos. Esta técnica de preservação de espécimes biológicos apresenta características que a colocam como uma ferramenta importante para uso no ensino de anatomia. Criado pelo Dr. Gunther von Hagens, da Universidade de Heidelberg, Alemanha, em 1977, este método pode ser feito com diferentes resinas: silicone, epóxi ou poliéster. O silicone é utilizado para corpos ou órgãos inteiros, enquanto

o poliéster e o epóxi são empregados em fatias de 2-3 mm de partes do corpo (VON HAGENS *et al.*, 1987).

2.1.3. Plastinação

A plastinação, quando comparada a outras técnicas de conservação, principalmente a formolização traz algumas vantagens como: altíssima durabilidade, ausência de odor desagradável e atoxicidade. Além disso, por manter mais fielmente as características dos tecidos, permite uma melhor observação, identificação, análise e manipulação das diferentes estruturas e órgãos, o que aumenta a motivação do aluno e influencia positivamente no processo ensino-aprendizagem da anatomia (GÓMEZ & ORTIZ, 2012; ANDREOLI *et al.*, 2012). A peça plastinada também dispensa a utilização de cubas de vidro com soluções conservantes para sua acomodação em espaços expositivos, o que antes da plastinação, se fazia necessário.

A conservação de espécimes pela plastinação tem feito com que a técnica se popularize e seja adotada em inúmeras instituições como faculdades, colégios e museus por todo o mundo (JONES e WHITAKER, 2009).

A técnica pode, didaticamente, ser dividida em quatro etapas: Fixação, Desidratação, Impregnação forçada e Cura. De início, o espécime passa pela etapa de fixação, onde ele é submetido a uma solução de formaldeído (10%) para formar as ligações cruzadas entre os tecidos biológicos, evitando assim a autólise das células, depois o espécime passa pela fase de desidratação, que é feita com álcool ou acetona e tem como objetivo a substituição dos fluidos corporais por um solvente intermediário. Segue-se, então, a impregnação forçada, na qual se aplica vácuo para a retirada da acetona e conseguinte a entrada do polímero no tecido. Por último, na etapa de cura ocorre o endurecimento do polímero, que já estava misturado com o reticulador – tetraetilortosilicato (**Figura 4**) na etapa anterior, por adição de uma combinação de catalisadores orgânicos a base de estanho: (Dibutil estanho dilaurato – DBTL) (**Figura 5**), carboxilato de dibutil estanho e compostos de triálquil estanho ou por aplicação de luz UV (Ultra Violeta). Em resumo, ao final do processo, a água e parte da gordura dos tecidos são substituídas pelo polímero em seu estado

sólido (VON HAGENS, 1987).



Figura 4 – Estrutura Molecular do Tetraetilortosilicato

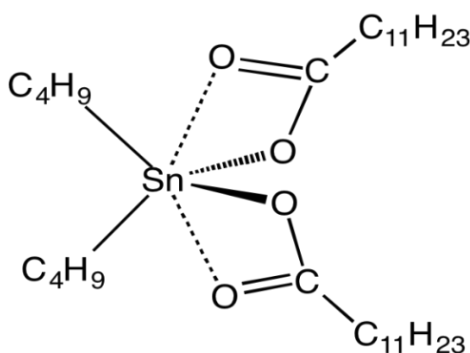


Figura 5 – Estrutura molecular do dibutil estanho dilaurato (DBTL).

Com a técnica de conservação dos espécimes por meio da plastinação, além de não ser necessário o uso de soluções conservantes tóxicas e de odor desagradável, como o formaldeído, a técnica aumenta imensamente a durabilidade das peças, inclusive para o manuseio, o que é extremamente útil para as atividades educativas em anatomia, sejam elas no ambiente acadêmico ou não (HENRY *et al.*, 2007).

Segundo Grondin (1998), no que se refere à divulgação científica, a plastinação permite que a ciência da anatomia e áreas correlatas, sejam trabalhadas de uma forma totalmente lúdica e artística, promovendo a aproximação do público a este conhecimento tão importante. Os avanços trazidos à educação pela plastinação são conhecidos, principalmente porque permite a substituição de modelos anatômicos por espécimes humanos reais e mais atraentes.

De acordo com Stuart e Henry (2002) o uso de espécimes plastinados resulta em progresso no estudo da anatomia, porque "uma maior quantidade de alunos saem das aulas de anatomia com uma melhor compreensão de como seu próprio corpo funciona".

Vários anatomistas concordam sobre a importância da plastinação, por ela "representar um grande avanço no ensino de anatomia, e ser cada vez mais uma ferramenta de pesquisa extremamente útil" (JONES e WHITAKER, 2009).

As contribuições educacionais da plastinação não estão restritas a universidades ou faculdades. Nos dias atuais, é possível visitar exposições sobre o corpo humano ao redor do mundo. Ao invés de serem, em grande parte, escondidos da opinião pública em laboratórios de dissecação e museus, corpos humanos são postos para exibição em grandes espaços de exposição (JONES, 2002).

O aspecto visual dos espécimes plastinados também é um fator de grande importância para se obter um produto ideal, ou seja, que conserva a aparência original do espécime e a cor é uma característica essencial para reproduzir um realismo satisfatório na percepção do espectador e inclusive salientado mais os detalhes anatômicos (KIM, 2012).

2.2. COR

Segundo Christie (2015), para que haja a cor são indispensáveis três propriedades: uma fonte luminosa, um corante que interaja com a luz que vem dessa fonte de iluminação e o olho humano para constatar o efeito que resulta. No entanto, a ausência de um desses pode-se dizer que a cor não existe.

Martins *et al.* (2015), relatam que os conceitos de cores e luz são unidos e, para o bom entendimento das cores na química, é necessário o entendimento do que é luz. A luz visível é composta por várias ondas eletromagnéticas que compreendem uma parte do espectro eletromagnético. As ondas eletromagnéticas apresentam duas características que a descrevem: a frequência e o comprimento de onda. A luz visível, ou o espectro visível, é uma parte do espectro eletromagnético cujas faixas de onda são percebidas como

cores pelos nossos olhos, sendo cada cor relativa a uma faixa de comprimento de onda.

Matsuhara *et al.* (2004) e Christie (2015), afirmam que a luz visível equivale à região do espectro eletromagnético (**Figura 6**) nos quais os nossos olhos conseguem enxergar e condiz à faixa que vai de 360 – 780 nm (nanômetro). Visto que a sensibilidade dos nossos olhos é pequena em cada extremidade dessa faixa, na prática o espectro visual é de 380 nm a 720 nm. Além das extremidades dessa faixa, encontra-se o ultravioleta que é a região do espectro que se refere abaixo de 360 nm e o infravermelho, que é a região acima de 780 nm.

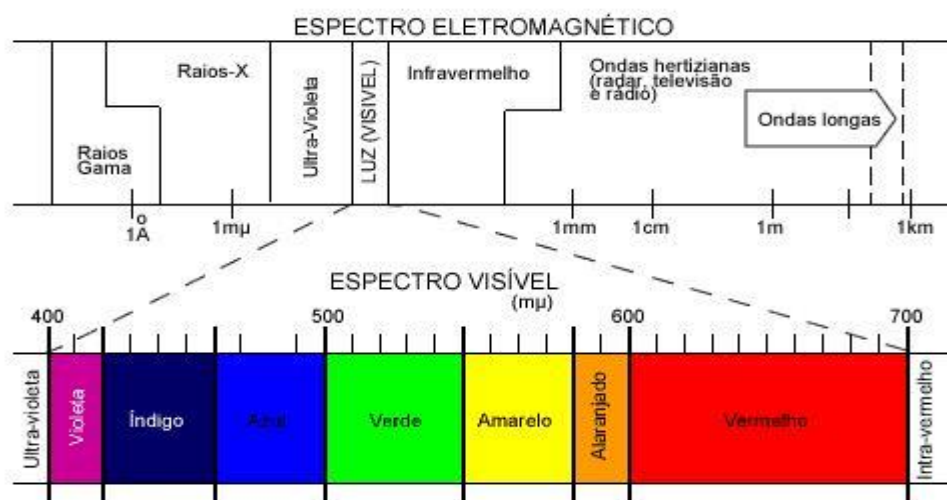


Figura 6 – Espectro Eletromagnético

Fonte: "Cor e frequência" em *Só Física*. Virtuuous Tecnologia da Informação, 2008-2018. Consultado em 12/08/2018 às 17:01. Disponível em: http://www.sofisica.com.br/conteudos/Otica/Refracaodaluz/cor_e_frequencia.php

A luz branca pode ser exemplificada como a mistura de todas as cores, ou o conjunto de ondas eletromagnéticas de várias frequências que engloba todo o espectro visível (MARTINS *et al.*, 2015). Dando ênfase ao fato de que a luz branca apresenta toda a faixa correspondente à região do visível, mas não na mesma intensidade.

Ainda consoante Martins *et al.* (2015), o espectro do visível apresenta início no vermelho, tendo um comprimento de onda em torno de 740 nm, encontrando-se na faixa de menor energia, e tem seu fim no violeta, com o comprimento de onda por volta de 380 nm, apresentando na faixa de maior

energia. As faixas de cor associadas a cada comprimento de onda encontram-se descritas na **tabela 1**.

Tabela 1 – Faixas associadas aos comprimentos de onda no visível

Cor	Comprimento de onda (nm)	Frequência (Hz)
Vermelho	625 – 740	480 - 405
Laranja	590 – 625	510 – 480
Amarelo	565 – 590	530 – 510
Verde	500 – 565	600 – 530
Ciano	485 – 500	620 – 600
Azul	440 – 485	680 – 620
Violeta	380 – 440	790 – 680

Fonte: (MARTINS *et al.*, 2015)

As cores podem ser observadas em compostos químicos, quando ocorre a absorção de energia no comprimento de onda no espectro do visível. No momento em que essa frequência que foi absorvida pela molécula for descontada da luz, o restante da luz será refletida e a cor que observada nesse processo, é a cor complementar. De acordo com o **esquema 1** pode ser visto a cor complementar de cada uma. No momento em que acontece a absorção de um comprimento de onda de uma cor, será observada a cor diretamente oposta. Logo, se uma substância absorve no laranja, a cor observada é o azul, e assim se for o contrário também, caso seja absorvido no azul, a cor observada será laranja.



Esquema 1 – Esquema de cores complementares no disco.
Fonte: (MARTINS *et al.*, 2015)

2.2.1. A Química das Cores

Nem todas as substâncias orgânicas apresentam coloração. Para que um composto tenha cor, são necessárias algumas especificidades da estrutura molecular. As cores dos corantes e de pigmentos são pertinentes à absorção, pelos compostos, da radiação eletromagnética na faixa que corresponde à luz no visível. Somente compostos orgânicos com uma série de ligações duplas conjugadas na sua estrutura química são capazes de absorver radiação na faixa da luz visível (MARTINS *et al.*, 2015; ISENMANN, 2013).

Uma das primeiras teorias para explicar como as cores dos corantes estão relacionadas com as suas referentes estruturas foi desenvolvida em 1876 por O. Witt. Ele propôs que as moléculas dos corantes apresentam grupos que são responsáveis por suas cores. Esses grupos são chamados de cromóforos (**Figura 7**), que são definidos como grupos de átomos responsáveis pelas cores dos corantes. Tratam-se de compostos insaturados, sendo que apenas um único grupo cromóforo é suficiente para produzir cor numa molécula orgânica (CHRISTIE, 2015; SHORE, 2002; IQBAL, 2008).

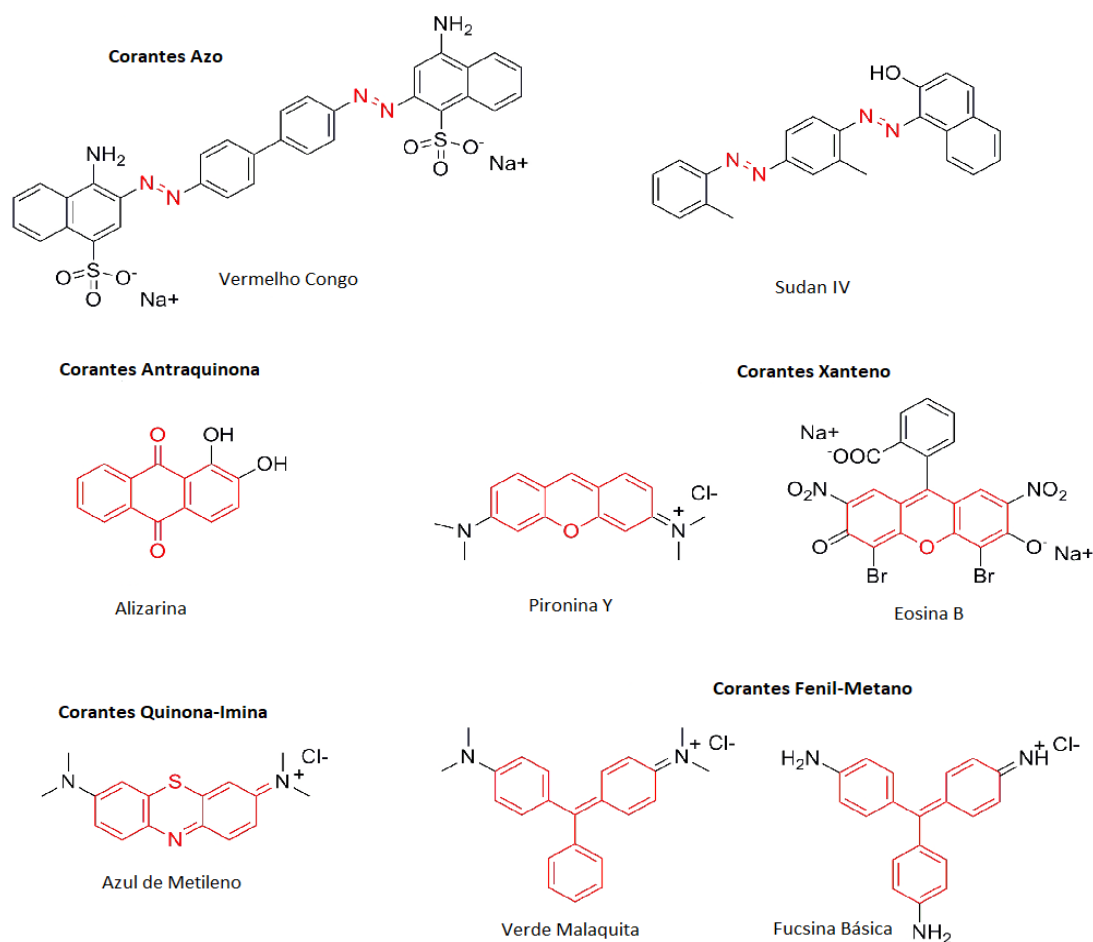


Figura 7 – Exemplos de grupamentos cromóforos.
Fonte: (VEUTHEY, 2014).

Embora o exposto explica a teoria da formação da cor de maneira bem simplificada, as cores podem ser investigadas através da teoria eletrônica. Em conformidade com a teoria eletrônica (ligação de valência), o firmamento por ressonância de estados excitados é responsável por absorções de energia na região do visível, explicando assim as propriedades dos compostos aromáticos. Esta teoria abrange uma série de postulados sobre estruturas orgânicas nas quais os elétrons estão deslocalizados nas ligações entre os átomos. Essas estruturas são chamadas estruturas de ressonância. Não há estruturas de ressonância particular, mas cada uma das estruturas contribui para a estrutura completa da molécula que é considerada um híbrido de ressonância (CHRISTIE, 2015; IQBAL, 2008).

Ainda de acordo com Christie (2015) e Iqbal (2008), quando ocorre a absorção das luzes ultravioleta ou visível por uma molécula, é promovida a

excitação do elétron e este é elevado a um orbital de maior energia. O comprimento da luz que foi absorvido depende da diferença de energia entre o estado excitado e o estado de menor energia da molécula. A menor diferença entre estes dois estados é o maior comprimento de onda que a luz absorveu que pode ser melhor visualizada de acordo com a equação ($\Delta E = h \cdot c / \lambda$), onde: ΔE = a variação de energia; h = Constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J.s); c = velocidade da luz no vácuo e λ = comprimento de onda.

A energia que é requisitada para diferença entre níveis de um elétron depende do ambiente do mesmo. Os elétrons que estão em ligações do tipo sigma (σ) são mais fortemente ligados, e uma alta energia (ou menor comprimento de onda) é preciso para possibilitar o deslocamento para níveis mais elevados de energia. Já os elétrons pi (π) são menos fortemente ligados e demandam menor energia (ou comprimento de onda maior) para serem excitados (IQBAL, 2008). Elétrons que se encontram em sistemas conjugados precisam de energia ainda menor, e com a conjugação e a ressonância dos elétrons, há um aumento do comprimento de onda da luz absorvida e a cor é observada na região do visível (IQBAL, 2008).

O orbital energeticamente mais alto que contém elétron(s) é denominado de HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia), o próximo orbital mais energético que está vazio é chamado de LUMO (orbital molecular desocupado de menor energia) (**Figura 8**). Quando a absorção da luz provoca a elevação de um elétron do HOMO para o LUMO, e depois há emissão de radiação que ocorre com a queda do elétron do LUMO para o HOMO (ISENMANN, 2013).

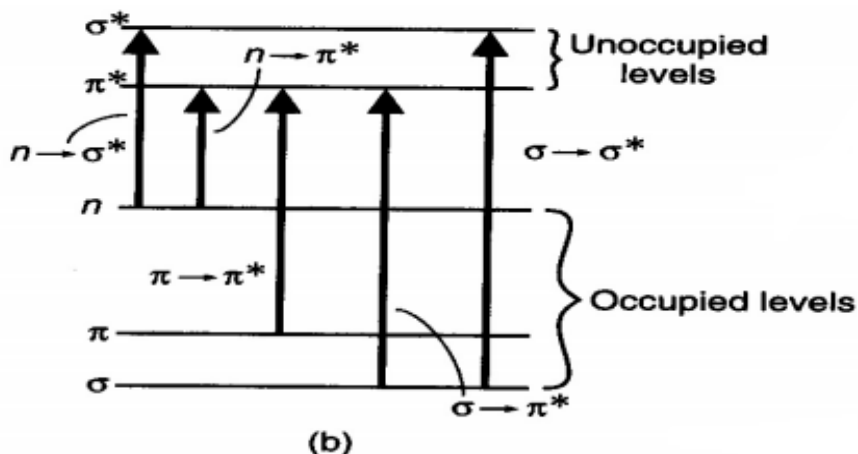


Figura 8 – Transição de elétrons em níveis de energia.

Fonte: <<http://www2.iq.usp.br/docente/henning/Aula2absUVVis.pdf>> - Acessado em 04/04/2018 às 19:20.

O espectro eletrônico tem a capacidade de revelar a energia necessária para promover um elétron do HOMO para o LUMO de uma molécula. Enquanto este elétron está no LUMO diz-se que o composto está excitado, e quando este elétron retorna para o seu estado fundamental, libera exatamente a mesma energia que foi absorvida. Esta energia, quando na região visível do espectro eletromagnético, proporciona a cor (ISENMANN, 2013).

Sartori e Loreto (2009) nos expõe que várias moléculas apresentam características de que quando são levadas a serem estimuladas por uma energia de radiação eletromagnética (com comprimento de onda propício), reemitem uma parte desta energia no formato de uma radiação visível. Os fótons em associação com essas radiações se relacionam com níveis de energia moleculares, iniciando assim o fenômeno da Fluorescência.

Consoante à **figura 9**, depois da absorção de radiação de comprimento de onda característico, a molécula passa do seu estado fundamental (S_0) para um estado excitado singleto (S_n). Depois de um determinado tempo, quando a molécula inicia o processo de perda de energia por processos rotavibracionais, ocorre o decaimento dessa energia que foi absorvida anteriormente e com isso a molécula atinge o primeiro nível vibracional do estado excitado singleto de menor energia (S_1). O processo no qual ocorre esse decaimento de energia é chamado de cruzamento interno (CI) e acontece sem emissão de radiação. No momento de S_1 , a molécula tem a capacidade de seguir dois caminhos para

retornar ao estado fundamental. De início, se a diferença de energia entre S_1 e S_0 não for muito grande e encontrar uma possibilidade da sobreposição dos níveis vibracionais, a molécula em questão, poderá ser induzida ao nível de menor energia vibracional de S_1 por diminuição da vibração sem a emissão de radiação eletromagnética e retornando assim para seu estado fundamental de nível S_0 . Agora, caso a diferença energética entre S_1 e S_0 seja muito grande, a volta da molécula para o seu estado fundamental se dá a partir da emissão de radiação sob forma de fluorescência.

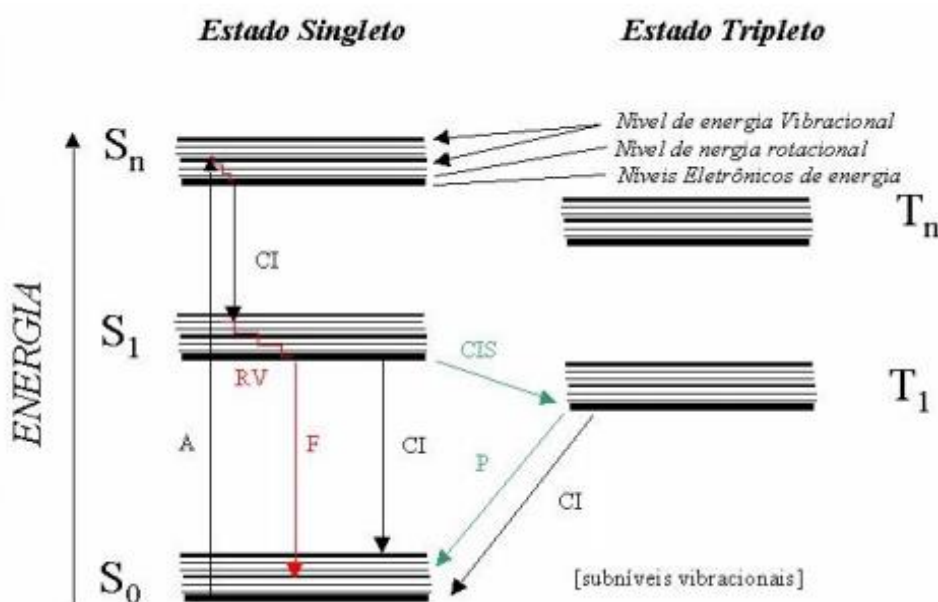


Figura 9 – Diagrama de Jablonski modificado

Fonte: <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/6260/6260_3.PDF> - Acessado em 30/09/2018 às 20:15.

2.3. COLORANTES

Os aditivos que são utilizados para conferir cor a algo são chamados de colorantes, e podem ser classificados como pigmentos e corantes. A diferença essencial entre pigmentos e corantes está no tamanho de sua partícula e de sua solubilidade no meio em que é inserido. Os pigmentos apresentam no geral, tamanho de partícula maior e são insolúveis, enquanto que corantes são moléculas solúveis e apresentam tamanho de partículas menores (SARON e FELISBERT, 2006).

2.3.1. Corantes

A cor, segundo Araújo (2004), é um fator que influencia significativamente a aceitabilidade de objetos de uma maneira em geral. Com o objetivo de melhorar a coloração e a aceitabilidade destes artefatos pelos consumidores, surgiram os corantes. Os corantes são substâncias responsáveis em transmitir cores ou exaltar as cores que os produtos já possuem, com a finalidade de melhorar o seu aspecto.

Os corantes foram muito utilizados em processos de preparação de alimentos e bebidas e ainda continua sendo em nível mundial, com grande contribuição durante o preparo e processamento destes. Já no início dos primeiros séculos, antes do surgimento de indústrias relacionadas à síntese de corantes, a coloração das fibras têxteis, era realizada por meio de plantas que continham corantes naturais (GAMARRA, 2006).

Seguindo as ideias de Veuthey *et. al* (2014), os corantes são compostos de origem orgânica, que apresentam tendência de se ligarem seletivamente a estruturas do tecido biológico. Não obstante, muitos corantes, originalmente, apresentam pouca afinidade pelos tecidos e um fraco potencial de gerar cor, essas características tem total capacidade de serem melhoradas por modificações na estrutura química de suas respectivas moléculas. Como já citado anteriormente, um cromóforo é uma parte da molécula que apresenta a capacidade de absorver fortemente a luz em um determinado comprimento de onda e transmitir ou refletir em outros. Como exemplos mais simples de cromóforos, podemos citar também as seguintes estruturas: $C=C$ (etileno), $C=O$ (cetona), $C=N$ (carboamínico), $N=N$ (azoico), $N=O$ (nitroso), NO_2 (nitro).

Essencialmente, estes grupos isolados absorvem a luz na região UV; entretanto, se estes grupos fizerem parte de um sistema π conjugado prolongado, a substância irá sofrer um desvio batocrômico (aumento do λ) para a região visível e torna-se colorida, no entanto um composto pode ser colorido, mas não apresenta a capacidade de corar o tecido, pois não tem eficácia para formar ligações com o mesmo (VEUTHEY *et. al*, 2014).

Por último, Veuthey *et. al* (2014), ainda nos relata que para transformar um composto colorido em um corante que tenha utilidade na histologia, é necessária a incorporação de um grupo ionizável que se liga às estruturas do tecido biológico. Habitualmente, esses grupos funcionais adicionados são chamados de auxócromos, sendo que estes estão ligados ao cromóforo da molécula para modificar a capacidade de absorção da luz do grupamento cromóforo, alterando o comprimento de onda ou a intensidade de absorção.

De acordo com Moran (1998), a classificação dos corantes é a adotada pelo Colour Index, que foi divulgada pela The Society of Dyers and Coulorists, e é dividida da seguinte maneira: **Corante à Cuba ou à Tina** (classe de corantes baseadas nos índigos, tioindigóides e antraquinóides; **Reativos** (são corantes contendo um grupo eletrofílico (reativo)); **Dispersos** (Constitui uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras de celulose); **Diretos** (solúveis em água e são capazes de tingir fibras de celulose); **Ácidos** (são corantes aniônicos); **Básicos** (são corantes catiônicos); **ao Enxofre** (após aplicação, se caracterizam por compostos com pontes de polissulfetos ($-S_n$)); **Mordentes** (os mordentes são compostos usados em conjunto com corantes que não podem ser aplicados diretamente sobre as fibras têxteis) e **Corantes Naturais** (Corantes **naturais** são corantes derivados de plantas, invertebrados, ou minerais). Pode-se levar em conta outra classificação de corantes, relacionada com a sua natureza (origem) e com os grupos funcionais, que é mostrado na **figura 10**.

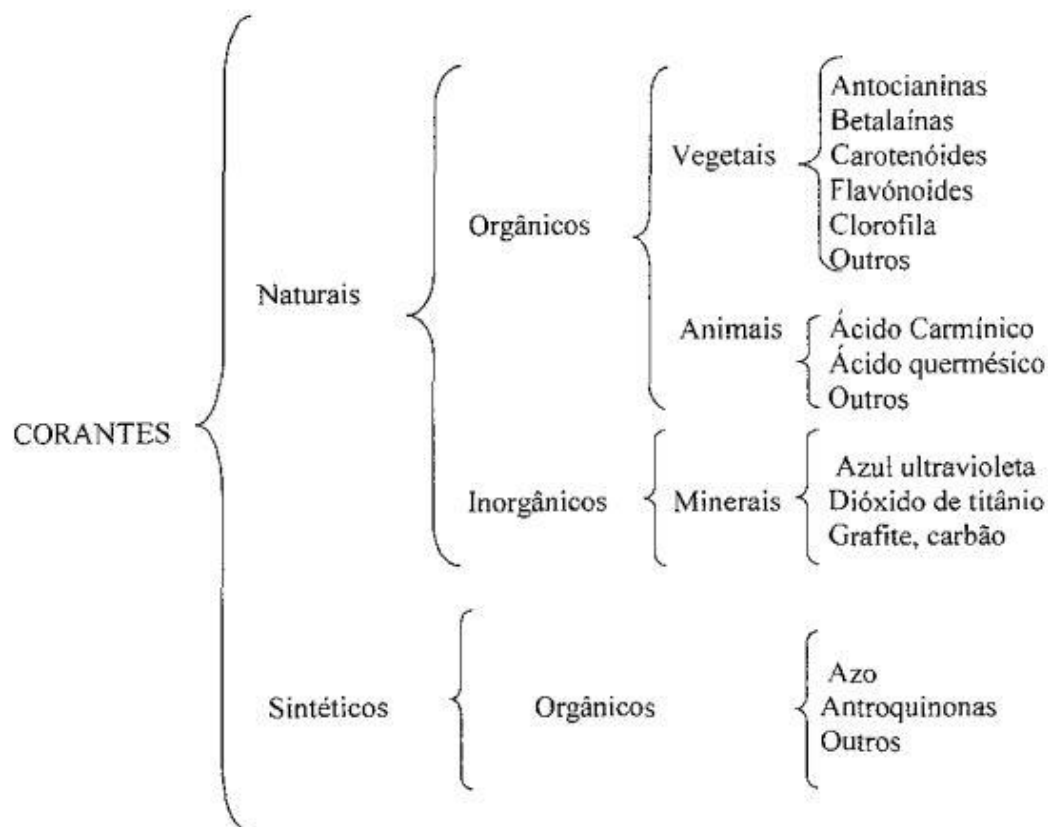


Figura 10 – Classificação dos corantes de acordo com sua origem.

Fonte: (GAMARRA, 2006).

Para a realização desta pesquisa, foram utilizados corantes sintéticos orgânicos e na literatura, estes corantes podem ser classificados em duas categorias de acordo com os grupos adicionados em suas moléculas: corantes ácidos e básicos.

2.3.1.1. Corantes ácidos

Corantes ácidos (aniônicos) apresentam cargas negativas em sua estrutura, como grupos laterais sulfonatos ($-\text{SO}_3\text{H}$), mas podem ser também os íons hidroxila ($-\text{OH}$), carboxi ($-\text{COOH}$) e enolato ($-\text{C}=\text{C}-\text{O}^-$) (**Figura 11**). O oxigênio do enolato faz parte do sistema conjugado, devido a isso, a carga neste átomo é menor do que a indicada por uma fórmula estrutural. Os ânions carboxílicos, também fazem parte do sistema conjugado quando estão presentes na molécula do corante e apresentam uma grande variação semelhante à

magnitude da carga no local suposto da ligação com o tecido. Já os íons sulfonatos, nunca fazem parte de sistemas conjugados e a sua carga real é correspondente à carga nominal (DAPSON, 2005).

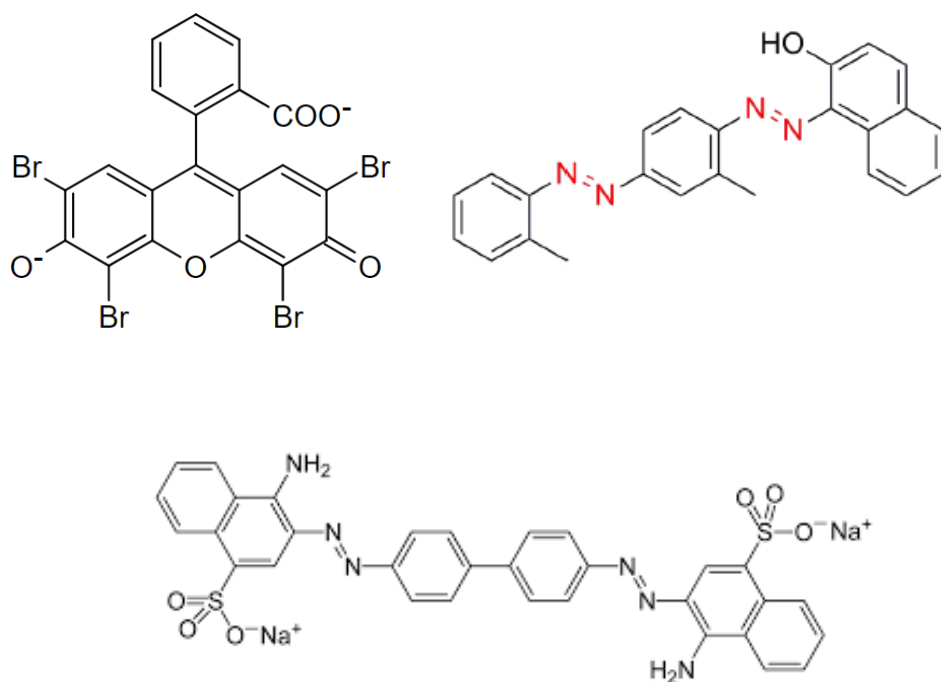


Figura 11 – Estruturas moleculares de corantes aniônicos – à esquerda (Eosina); no meio (Vermelho Congo) e à direita (Sudan IV).

Fonte: (VEUTHEY *et al*, 2014).

A maioria dos corantes aniônicos de baixa massa molecular não forma em baixa concentração agregados em solução aquosa. Quanto maior o número de grupos carregados, menor a tendência a agregar. As posições dos grupos carregados também geram influencia no grau de associação e essa associação de corantes aniônicos causa efeitos espectrais menos acentuados do que a associação de corantes catiônicos (PRENTO, 2001).

2.3.1.2. Corantes básicos

Na maioria das vezes, os corantes básicos apresentam uma carga positiva (que incluem aminas primárias (-NH₂) (Figura 12), secundárias (-NHR) e terciárias (NR₂)), deslocalizada como parte do sistema cromóforo aromático,

como por exemplo, a carga que é na verdade um déficit de elétrons (PRENTO, 2001; VEUTHEY *et al*, 2014).

Para ser caracterizado como um corante catiônico, na estrutura da molécula deve conter cátions de nitrogênio. Corantes catiônicos são chamados de corantes básicos e tem afinidade por estruturas ácidas, ou seja, esse tipo de corante também é conhecido como acidófilo (DAPSON, 2005; PRENTO, 2009).

Prento (2001), ainda ressalta que muitos corantes catiônicos se associam quando estão em solução de maneira a formarem dímeros, isso em baixas concentrações e a formarem agregados, quando estão em maiores concentrações. Como a carga faz parte do sistema aromático, a dimerização deve ocorrer sem a separação completa das cargas do corante.

Dapson (2005) retrata que, átomos exemplificados como cátions em suas fórmulas estruturais, raramente têm uma carga positiva significativa no sítio de carga suposta. Os corantes básicos contêm o cátion oxênio ($R=O^+ - R$) ou qualquer um dos vários cátions nitrogenados (**Figura 12**). Em quase todos os casos, a carga é deslocalizada através do sistema conjugado, bem como através de tautomerismo, no qual o local da carga muda de um átomo de nitrogênio para outro, de um átomo de oxigênio do oxênio ou para um átomo de enxofre.

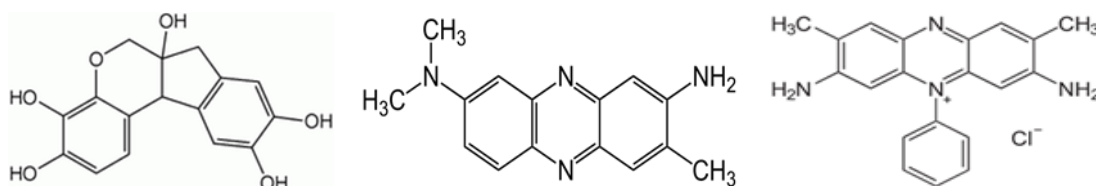


Figura 12 – Estruturas moleculares de corantes catiônicos – Hematoxilina (à esquerda), Safranina (no meio) e Vermelho Neutro (à direita).

2.3.2. Floxina B

Rasooly e Weisz (2002) relatam que o corante Floxina B (Color Index nº 45410) é um corante aditivo da classe dos xantenos, sendo utilizado para corar alimentos no Japão e Estados Unidos e aplicado na área de cosméticos. Esses mesmos autores ainda apresentam que a Floxina B também pode demonstrar um efeito antimicrobiano nas bactérias Gram negativas após o tratamento com

ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para aumentar a permeabilidade da parede celular dessas bactérias e a membrana da camada externa que o rodeia, permitindo que o corante penetre na célula. De acordo com a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – (Fispq) desse composto, a molécula da Floxina B tem como fórmula molecular $C_{20}H_2Br_4Cl_4Na_2O_5$ (**Figura 13**) e apresenta massa molecular de 829,7 g/mol.

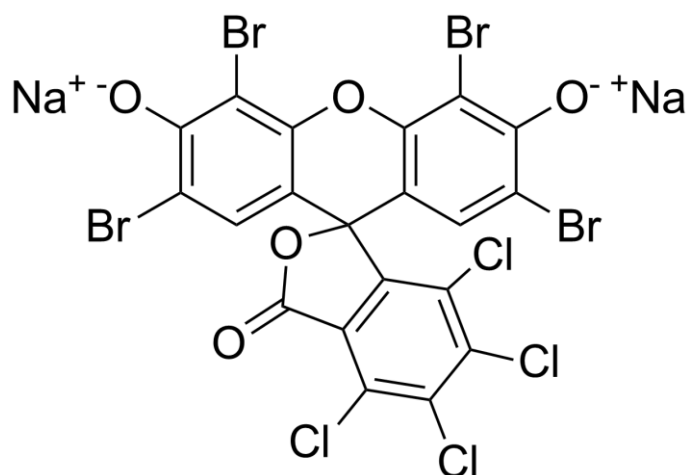


Figura 13- Fórmula Molecular do corante Floxina B.

Essa molécula apresenta como grupo cromóforo (parte que fornece cor para molécula) o grupamento xanteno (**Figura 14**). Xantenos são compostos cíclicos formados por três anéis aromáticos em um arranjo linear contendo um átomo de oxigênio na parte central do anel e que absorvem luz na região do visível. (DUARTE *et al.*, 2012; PERUSSI, 2007).

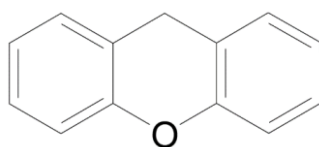


Figura 14 – Estrutura Molecular do grupamento xanteno.

Daré - Doyen *et al.* (2003), relata que devido à estrutura rígida dos anéis da estrutura dos corantes xantenos possuem fluorescência e são solúveis em solução aquosa em concentrações abaixo de 5×10^{-3} mol/L.

Conforme Dapson (2005) existem três ânions para caracterizar que um corante seja categorizado como ácido: enolato, sulfônico e carboxil. Diante do exposto, a molécula da Floxina B apresenta como grupo auxócromo (o ânion), o íon enolato e por isso, a Floxina B é caracterizada como um corante ácido e o autor ainda ressalta que os ânions enolatos são mais conhecidos em moléculas que apresentam grupamento xanteno.

Os corantes de xanteno são provavelmente a classe mais intensamente estudada de corantes luminescentes (fluorescência). O interesse tem sido estimulado tanto pelas características espectrais especiais dos corantes quanto por sua ampla gama de aplicações como corantes biológicos, agentes traçadores, agentes fotocrômicos e termocrômicos e corantes a laser (MAGDE *et al.*, 1999).

2.3.3. Safranina

A Safranina (Color Index nº 50240) é um corante carregado positivamente (corante catiônico) o qual pertence à classe Fenazina (**Figura 15**) (AKERMAN, 1976; LOFRUMENTO, 2015). De acordo com a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – (Fispq) desse composto, a molécula da Safranina tem como fórmula molecular $C_{20}H_{19}ClN_4$ (**Figura 16**) e apresenta massa molecular de 350,84 g/mol.

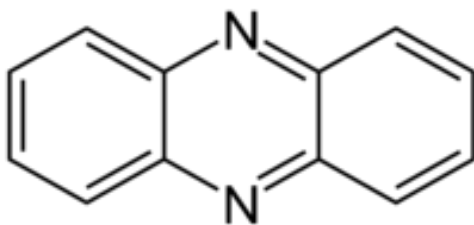


Figura 15 – Estrutura Molecular do cromóforo Fenazina

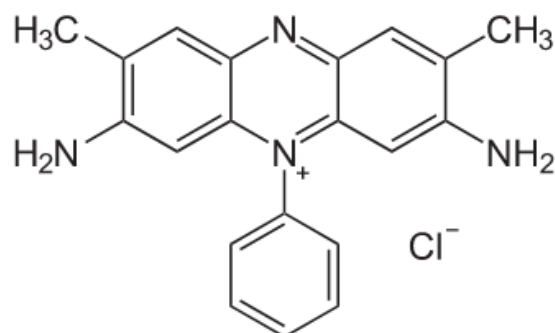


Figura 16 – Estrutura Molecular do corante Safranina

Na histologia, o uso da Safranina serve para identificação de células da cartilagem das articulações. A ligação deste corante com os ânions da cartilagem é feita da seguinte maneira: o corante liga-se a cada carga negativa do sulfato de condroitina e do sulfato de queratina e não se liga ao colágeno (ROSENBERG, 1971).

Valle (1986) ressalta que a Safranina se for empregada em condições especiais, pode-se ser utilizada como indicador de potencial elétrico de membrana mitocondrial.

2.3.4. Fucsina Fenicada (Carbolfucsina)

De acordo com Siqueira (1987, *apud* SIQUEIRA *et al.*, 1984), o início da utilização da Fucsina foi por Erlich em 1882, dissolvida em óleo de anilina. Muitas pesquisas com o objetivo de obter um sistema seguro na prática diagnóstica de bactérias começaram a utilizar fenol em uma solução hidro alcóolica de fucsina básica (Color Index nº 42510).

Segundo a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – (Fispq) do corante utilizado, a molécula da Fucsina Básica tem como fórmula molecular $C_{20}H_{17}ClN_3$ (**Figura 17**) e apresenta peso molecular de 337,5 g/mol.

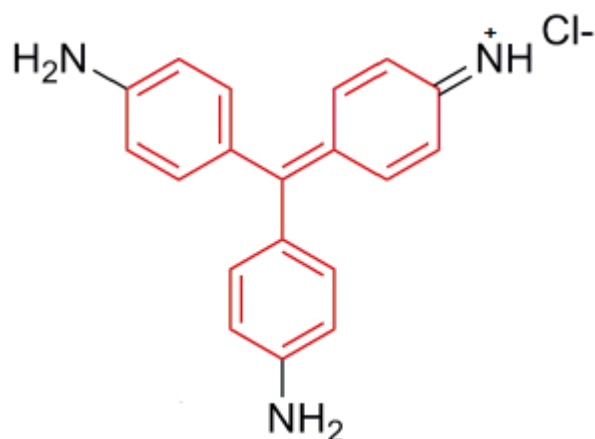


Figura 17 – Estrutura Molecular do corante Fucsina Básica.

Siqueira (1983) relata que no início a fucsina não era bem caracterizada e que hoje se encontra três tipos de fucsina: a pararosanilina, a rosanilina e a fucsina nova, todas pertencentes à classe química Triarilmetano (TAM) (**Figura 18**), e diferenciadas entre si apenas pelo número e a posição dos radicais ligados à estrutura principal.

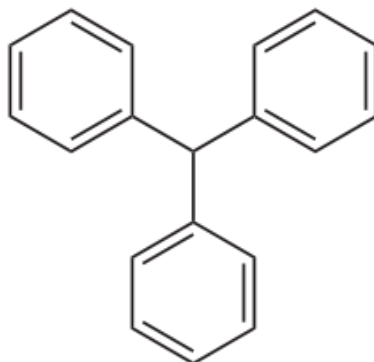


Figura 18 – Estrutura Molecular do cromóforo Triarilmetano.

A literatura nos informa que a utilização dessa solução colorante é empregada no ramo da microbiologia, mais precisamente no método de Ziehl-Neelsen para diferenciação de bactérias Gram negativas de Gram positivas. Também se encontra aplicação desse corante na coloração de cromossomos sexuais, devido a sua grande interação com o material genético por se tratar de um corante catiônico (corante com carga positiva que é atraído por estruturas

com cargas negativas) (CARR, 2014). Ainda não se tem estudos relacionados a plastinação com aplicação desta solução colorante.

2.3.5. Tricrômico de Masson

De acordo com Bancroft e Stevens (2002, *apud* FERRO, 2006), o termo Tricrômico é utilizado para soluções que apresentam três corantes em sua composição (Fucsina Ácida, Ponceau de Xilidina e Orange G).

Consoante Goldner (1938), o método Tricrômico de Masson continua sendo um dos melhores, combinando com a técnica mais precisa das hematoxilinas (ferro de Heidenhain hematoxilina) com uma coloração citoplasmática confiável que dá uma riqueza de detalhes (Fucsina Ácida com Ponceau de Xilidina), e um efeito muito seletivo para corar tecido conjuntivo (verde claro ou azul anilina). O corante citoplasmático (Orange G) é adicionado para acentuar os eritrócitos, aumentar os tons amarelos e proporcionar uma cor suplementar no método da coloração.

Segundo Moral (1993, *apud* FERRO, 2002), o princípio de atuação deste método de coloração, está baseado na diferença da permeabilidade que há entre as fibras de colágeno e os elementos do tecido que estão ao redor. O que se encontra na literatura a respeito do método de coloração por Tricrômico de Masson, é que é realizado para corar músculo, citoplasma e fibras de colágeno basicamente (GOLDNER, 1938).

Na Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – (Fispq) da Fucsina ácida (Color Index nº 42685) apresenta como fórmula molecular $C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$ (**Figura 19**), com massa molecular de 585,538 g/mol e apresenta a mesma estrutura de grupo cromóforo da Fucsina Básica, o grupamento Triarilmetano.

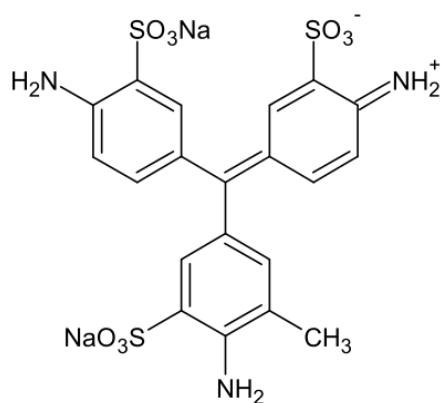


Figura 19 – Estrutura Molecular do corante Fucsina Ácida.

Segundo Dapson (2005), este corante tem caráter predominantemente ácido por ter grupamento sulfônico em sua estrutura.

Outro corante que compõe a solução do Tricrômico de Masson é a Ponceau de Xilidina (Color Index nº 16150) ou chamado também por Ponceau 2R. Sua fórmula molecular é $C_{18}H_{16}N_2O_7S_2Na_2$ (**Figura 20**) e massa molecular de 436,461 g/mol. Também é um corante ácido por apresentar ânion sulfônico em sua estrutura e apresenta como cromóforo, o grupamento Azo (**Figura 21**) (RIBEIRO, 2013).

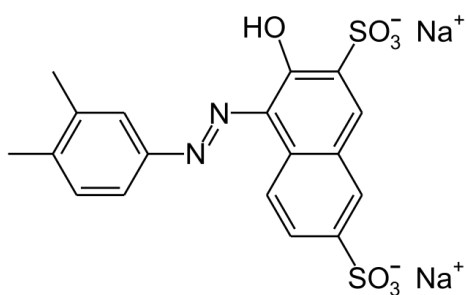


Figura 20 – Estrutura Molecular do corante Ponceau de Xilidina.

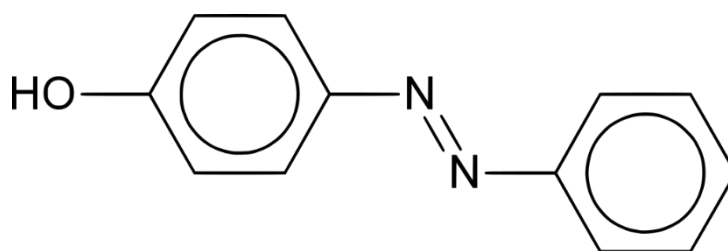


Figura 21 – Estrutura Molecular do cromóforo Azo.

Por último, está o corante Orange G (Color Index nº 16230), que tem como fórmula molecular $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ (**Figura 22**) e apresenta 452,38 g/mol como massa molecular. Também é um corante caracterizado como ácido, devido à presença de ânion sulfônico e apresenta o mesmo grupamento cromóforo do corante Ponceau 2R.

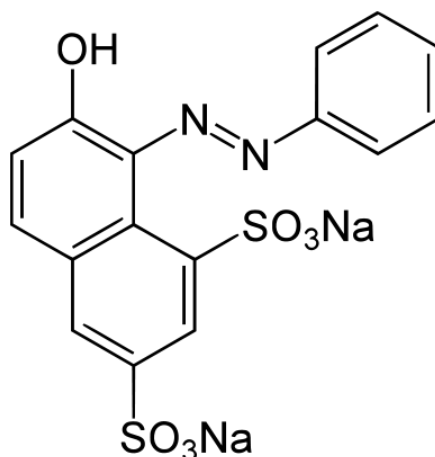


Figura 22– Estrutura Molecular do corante Orange G.

Os três corantes que compõe o Tricômico de Masson são misturados em 300 mL de ácido acético. Chang (1994) comenta a respeito da utilização do ácido acético na solução colorante. O ácido acético é adicionado para conservar a solução colorante por mais tempo, para intensificar a coloração e assim deixar que não tenha alteração na cor ao longo da utilização das lâminas.

2.4. TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

O músculo esquelético (**Figura 23**) é um dos tecidos mais dinâmicos e plásticos do corpo humano. Em humanos, o músculo esquelético compreende aproximadamente 40% do peso total do corpo, contém 50-75% de todas as proteínas do corpo e é responsável por 30% a 50% do turnover proteico de todo o corpo. O músculo é composto principalmente de água (75%), proteína (20%) e outras substâncias, incluindo sais inorgânicos, minerais, gorduras e carboidratos (5%) (FRONTERA e OCHALA, 2014).

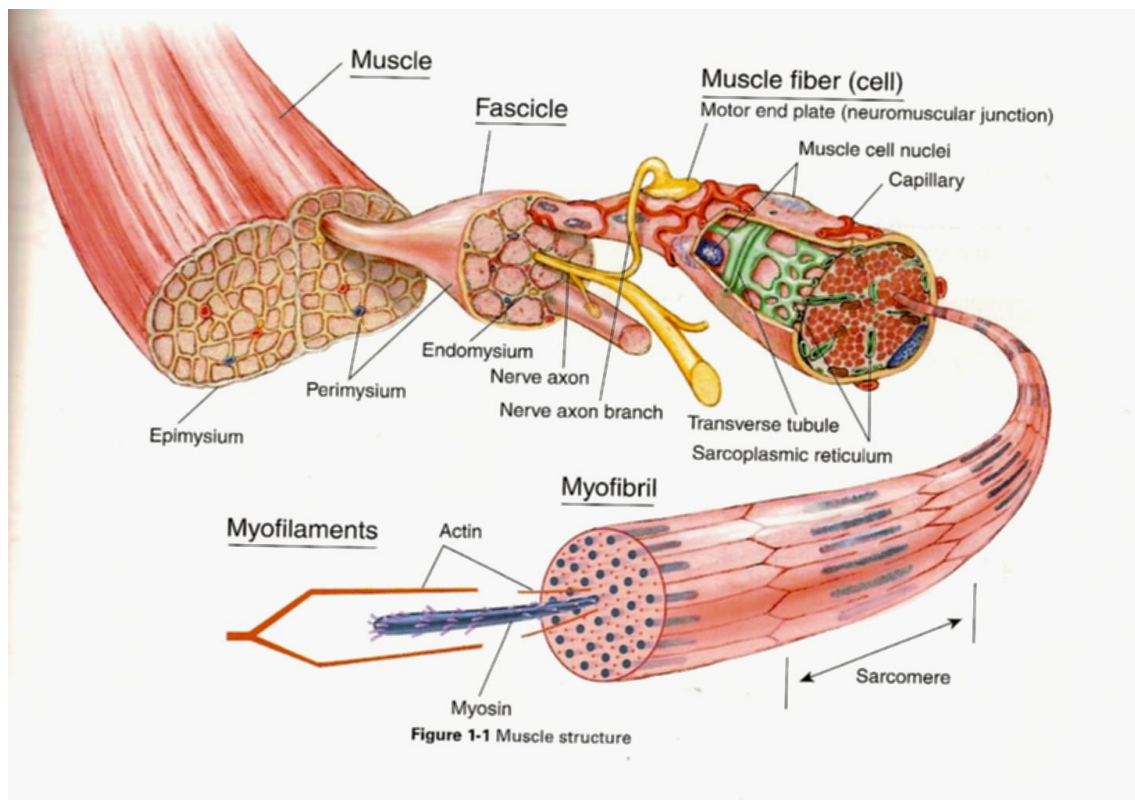


Figura 23 – Estrutura do músculo esquelético.

Fonte: <<https://detiina.com/muscular-structure-and-function/muscular-structure-and-function-more-facts-about-massage-the-structure-of-a-muscle/>>- Acessado em : 07/04/2018 às 21:45.

Cada fibra muscular contém muitos feixes cilíndricos de filamentos, as miofibrilas, que medem de 1 a 2 μm de diâmetro, são paralelas ao eixo maior da fibra muscular e consistem no arranjo repetitivo de sarcômeros. As miofibrilas do músculo estriado contêm quatro proteínas principais: **miosina**, **actina**, **tropomiosina** e **troponina** (FRONTERA e OCHALA, 2014; HUXLEY e HANSON, 1954).

2.5. COLORAÇÃO DE TECIDOS BIOLÓGICOS

A coloração de tecidos de tecidos biológicos envolve dois atos separados durante o processo da ação dos corantes: o direcionamento das moléculas do corante para o sítio de ligação e a fixação do corante ao seu substrato (ligação feita). O primeiro é o resultado da difusão, que opera aleatoriamente para aproximar as moléculas de corantes aos locais de ligação, seguidas por forças propulsoras (atraentes) que aproximam as moléculas dos corantes para as mediações mais próximas de seu substrato (DAPSON, 2005).

Dapson (2005) nos descreve que em algumas situações, pode ocorrer a ação de certas forças repulsivas que afastam os corantes de certos substratos ou podem fazer com que um corante deixe seu solvente de preferência por um ambiente mais complementar (como na coloração de gordura). Alguns mecanismos para formar as ligações atuam como forças propulsoras, outros não, e alguns exigem forças diferentes, não vinculadas, para unir as moléculas do corante ao tecido (**Figura 24**). O mesmo autor ainda disserta a respeito de que o conceito de carga leva em consideração sua presença ou ausência, magnitude, a extensão da deslocalização dos elétrons ao longo da molécula e o potencial para ser deslocado por forças externas, salientando também todos os fenômenos de ligação.

As ligações covalentes envolvem o compartilhamento de elétrons; elas são muito fortes e essencialmente irreversíveis nas condições encontradas durante a coloração. Já as ligações covalentes polares dentro da molécula do corante geram cargas atômicas parciais que criam o potencial de ligação de hidrogênio. Isso é medido pelo parâmetro de ligação de hidrogênio (h) e com o número de grupos de cargas dentro das faixas de $-0,15$ a $-0,50$ eV ou $+0,15$ a $+0,30$ eV. Em contrapartida, leva-se em consideração também, o potencial de ligação iônica que é indicado pela carga líquida (Z), enquanto a força de tais ligações é uma função da geometria do local onde está a carga em ambos os componentes que participam da ligação. Uma interação entre a molécula do corante e o tecido biológico, ocorre pela deslocalização dos pares de elétrons das duplas ligações do anel aromático da estrutura do corante. Esses elétrons se movimentam ao longo da molécula do corante e ocorre a formação de cargas pontuais nos auxócromos da molécula. Com isso acontece também a polarização da nuvem eletrônica dos halogênios que estão ligados ao corante e que estão próximos ao grupamento auxócromo, gerando assim uma carga parcialmente negativa. Essa carga negativa irá interagir de maneira eletrostática com os sítios (locais/estruturas) do tecido biológico que apresentam carga parcialmente positiva. A deslocalização da carga é devida a conjugação, grupos de influência de elétrons e a ressonância que criam locais de carga suaves nos quais a carga iônica é distribuída por um grande volume da molécula (DAPSON, 2005 ; PRENTO, 2001).

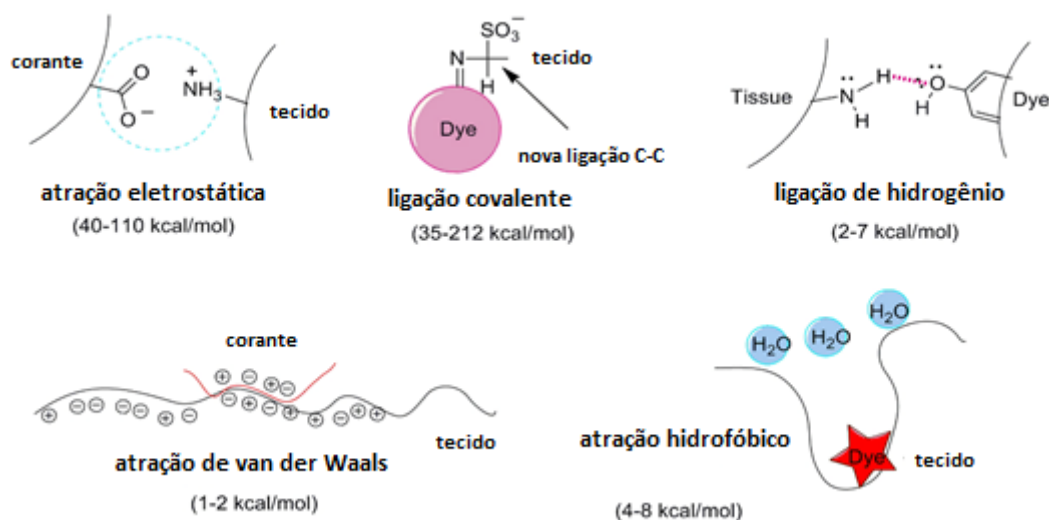


Figura 24 – Exemplos de mecanismos de ligações entre corantes e tecidos biológicos.

Fonte: (VEUTHEY *et al.*, 2014).

Moléculas com cargas mal deslocalizadas ou que apresentam cargas pontuais, apresentam cargas denominadas de duras (pois são pequenas em volume) e com isso gera a formação de ligações firmes. As ligações firmes são provenientes de sistemas com pares de cargas do tipo dura - dura ou macia - macia. Por outro lado, as combinações de cargas do tipo dura – macia (que envolve volumes pequenos e grandes), são prontamente deslocadas em interações competitivas e interrompidas por solventes (DAPSON, 2005; VEUTHEY *et al.*, 2014; PRENTO, 2009).

Por último, Dapson (2005) mostra que três diferentes atrações de van der Waals também incluem a parte restante dos tipos de ligação, com todas envolvendo dipolos: Forças de Keesom (dipolo-dipolo), forças de Debye (dipolo induzido por dipolo) e forças de London (dipolo induzido por dipolo induzido).

2.6. AÇÕES DE DEGRADAÇÃO DOS CORANTES

Os corantes são caracterizados pela capacidade de absorver a luz visível. Em função do fato destes colorantes absorverem luz com elevada eficiência, em alguma região do espectro visível, alguns desses compostos são capazes de impulsionar ou de se envolverem em reações fotoquímicas (ZOLLINGER, 1991).

No momento em que a luz UV é aplicada em corantes, apenas na presença de oxigênio (sem fotocatalisadores ou precursores de radical hidroxila), observam-se graus de descoloração. Finalmente, a irradiação UV pode causar uma descoloração completa da solução. No entanto, os tempos de irradiação necessários para obter uma solução sem coloração são variados para cada corante (GALINDO *et al.*, 2001).

Quando há absorção de luz pelos grupos cromóforos dos corantes, os mesmos podem passar para estados de maior energia, e durante esse período, podem ocorrer reações com o oxigênio molecular (O_2) e formar oxigênio singlete (1O_2), ou serem desativados por regimes fotofísicos e voltar ao seu estado eletrônico fundamental, ou podem também liberar a energia por fluorescência ou fosforescência (GOMES, 2000).

Segundo Gomes (2000), quando o oxigênio molecular se encontra em condições normais, não configura reação direta com outros compostos, sendo assim, tendo a chance de ser ativado eletronicamente pela absorção de energia e passando para um estado energético mais excitado, apontado como oxigênio singlete. O mesmo tem a possibilidade de fazer reações com as duplas ligações do grupo cromóforo e assim podendo formar compostos chamados de hidroperóxidos. Estes hidroperóxidos tem a capacidade de originar radicais livres por meio de rupturas homolíticas das ligações e devido a este fato, o corante vai perdendo a sua coloração por causa da quebra das ligações do grupamento do cromóforo.

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

A conservação de espécimes pela plastinação, com maior durabilidade, sem cheiro, de aparência e coloração agradáveis e próximas da realidade, tem feito com que a técnica se popularize e seja adotada em inúmeras instituições como faculdades, colégios e museus por todo o mundo (JONES e WHITAKER, 2009).

A plastinação, quando comparada a outras técnicas de conservação, principalmente a formolização traz algumas vantagens como: altíssima durabilidade, ausência de odor desagradável e fácil transporte. Além disso, por manter mais fielmente as características dos tecidos, permite uma melhor observação, identificação, análise e manipulação das diferentes estruturas e órgãos, o que aumenta a motivação do aluno e influencia positivamente no processo ensino-aprendizagem da anatomia (GÓMEZ e ORTIZ, 2012; ANDREOLI *et al.*, 2012).

O aspecto visual dos espécimes plastinados também é um fator de grande importância para se obter um produto ideal, ou seja, que conserva a aparência original do espécime (KIM, 2012), e a cor é uma característica essencial para reproduzir um realismo satisfatório na percepção do espectador e inclusive salientado mais os detalhes.

Consoante Frontera e Ochala (2014), o músculo esquelético é um dos tecidos mais dinâmicos e plásticos do corpo humano e nos seres humanos, o mesmo, compreende aproximadamente 40% do peso corporal total e contém 50-75% de todas as proteínas do corpo. O conhecimento da estrutura e constituintes básicos do músculo, bem como da sua bioquímica, é fundamental para se buscar uma coloração deste tecido.

De acordo com Kang *et al.* (2015), A coloração de plastinados pode servir como uma ótima ferramenta de aprendizagem para estudantes que têm dificuldades em distinguir certas estruturas vasculares e tecidos. Kang *et al.* (2015), ainda ressalta que várias técnicas de coloração para destacar as estruturas de espécimes plastinados foram desenvolvidas por pesquisadores, cada um com suas próprias vantagens (maior clareza de estruturas) e desvantagens (alguns métodos de coloração não sendo aprovados por

estudantes). Porém, o que a literatura nos mostra, é que essas técnicas que estão relacionadas com coloração do tecido muscular plastinado são realizadas com pigmentos/tintas à base de silicone ou da utilização de outras resinas coloridas como epóxi vermelho e azul, fazendo assim com que a coloração de peças plastinadas fique mais caro, devido à aquisição desses produtos.

Resolver a coloração diferenciada em espécimes plastinados tem sido tentado inúmeras vezes e durante várias etapas do processo de plastinação (VON HAGENS et al., 1987; HENRY et al., 2007).

Muito se é falado a respeito de coloração de espécimes de Sistema Nervoso com aplicação de corantes da histologia como citado por (Suriyaprapadilok et al., 1997) para diferenciação tecidual, mas não se encontra pesquisas inteiras relacionadas a coloração de outros tecidos celulares utilizando essa espécie de corantes. O problema da adição de um corante ou banho químico é que todo o espécime é introduzido a esta coloração, ou pelo menos uma parte bruta, isso de acordo com (McCreary et al., 2013), porém não se é encontrado estudos relacionados a corantes que são seletivos para corar músculo e não interagindo com outros tecidos, utilizando a técnica de coloração por meio do banho na peça no corante.

Pela carência de informações a outras maneiras de coloração destes espécimes disponíveis na literatura, o nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Plastinação da Universidade Federal do Espírito Santo, que está associado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, vem desenvolvendo estudos para coloração de tecido muscular de peças plastinadas utilizando corantes histológicos.

No caso de nosso trabalho, nós estamos em busca de um corante que tenha caráter hidrofílico para que não venha interagir com tecidos de gordura e que em determinadas concentrações, não core células do epitélio. Um corante ideal para este propósito seria de preferência um que não apresente tamanho de sua molécula muito grande, para que ocorra interação entre as cargas do corante com o músculo, pois o tamanho da molécula pode interferir no momento da coloração e assim não fazendo o processo por completo. Isso ocorre devido ao fato de simplesmente ser depositado nas fibras dos músculos sem ocorrer

reação entre corante – tecido. Em relação a sua carga para tal procedimento, pode ser catiônico ou aniônico, pois ao longo das fibras musculares e até mesmo no citoplasma das células, encontram-se cargas negativas e positivas e dessa forma irá interagir com o corante.

Segundo Raoof *et al.* (2013), ao corar espécimes, vasos sanguíneos ou até mesmo nervos que são codificados por cores para fornecer modelos visuais aprimorados para o aprendizado, os estudantes da área da saúde, podem visualizar e manipular estes espécimes e distinguir melhor os padrões anatômicos específicos. No entanto, esses espécimes quando pintados por alguma tinta específica para silicone ou até mesmo por uma resina colorida, o manuseio dos mesmos, pelos estudantes, tornou-se um problema devido a danos ou o desgaste nas tintas. De modo particular, para peças anatômicas maiores com tecido muscular esquelético em exposição, ainda não há evidências de pesquisas semelhantes que fazem a utilização de corantes histológicos para realizar a coloração desses espécimes.

Em função dos problemas relatados pelo uso de tintas para realçar a tonalidade das peças, a utilização de corantes para essa finalidade, apresenta vantagem em relação às tintas. Quando os espécimes são tingidos por meio de corantes na etapa de fixação, ocorre uma interação entre as cargas da molécula do corante com as cargas das proteínas do tecido (DAPSON, 2005), ou seja, o corante não fica simplesmente aderido à superfície do tecido biológico como no caso da aplicação das tintas às peças. Pode-se analisar também, pelo fato de que quando se faz a utilização de corantes, o material colorante fica protegido pelo silicone na peça e assim evitando o desgaste perante o manuseio.

Outra vantagem de se utilizar corantes histológicos para a coloração de tecido muscular esquelético em relação ao uso de tintas ou resinas coloridas para tingimento de peças é a respeito do preço. Em sites relacionados a produtos de silicone, é encontrado à venda um kit com nove cores com 10 gramas de cada pelo preço de R\$ 239,90. Já um pote de corante de Safranina, por exemplo, contendo 25 gramas, custa em torno de 68,57 reais. Cabe ressaltar, que ao nosso conhecimento, não existem estudos publicados que façam uma possível

comparação em relação a vantagens e desvantagens da utilização de tintas e corantes histológicos aplicados a plastinação.

Diante do exposto, entendeu-se que o estudo e o avanço das pesquisas na área da plastinação são de grande relevância para que possamos nos tornar autossuficiente na produção de insumos (polímeros, corantes e catalizadores) e métodos da técnica de plastinação, e com isso melhorar a qualidade do trabalho e estudo nas áreas anatômicas e correlatas, bem como facilitar a sua difusão e popularização científica, em especial no Brasil.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Coloração de tecido muscular de espécimes anatômicos para aplicação no processo de plastinação.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e testar, corantes histológicos que tenham afinidade por tecido muscular, com potencial aplicação no processo de plastinação;
- Desenvolver um protocolo de coloração para aplicação dos corantes escolhidos no processo de plastinação;
- Avaliar a afinidade dos corantes testados, analisando tecidos de músculo esquelético, pele e gordura por microscopia;
- Caracterizar as soluções dos corantes por meio de métodos espectrofotométricos;
- Avaliar a degradação das soluções dos corantes sob a ação da luz.

Materiais e Métodos

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho se caracteriza como uma pesquisa aplicada, contendo um levantamento bibliográfico e protocolos experimentais. A parte experimental foi realizada principalmente no Laboratório de Plastinação do Museu de Ciências da Vida, no Laboratório Histotécnico, que ficam localizados no Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde, localizado no *Campus* de Maruípe da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Vitória – ES, e também no Laboratório de Físico-Química do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES) – *Campus* Aracruz. Teve financiamento concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (bolsa de mestrado), e auxílio financeiro pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES).

De início, foi realizado um levantamento bibliográfico e estudos prévios a respeito de corantes histológicos para possível aplicação junto à técnica de plastinação, levando-se em conta a viabilidade e exequibilidade do trabalho. Após isso, escolheram-se os corantes que foram disponibilizados pelo laboratório histotécnico da Universidade Federal do Espírito Santo – *Campus* de Maruípe. Na escolha dos corantes, optou-se por utilizar colorantes que possuem caráter ácido ou básico, com grupos cromóforos e tamanhos de moléculas diferentes, para averiguar como cada corante se comporta no tecido alvo, que no caso desta pesquisa foi o músculo estriado esquelético. Os corantes selecionados também apresentaram cores próximo ao vermelho para mimetizar o aspecto real da coloração de músculo. Dos corantes disponíveis no laboratório, obedecendo a esses quesitos citados anteriormente, foram designados para esse experimento: Floxina B, Safranina, Fucsina Fenicada e Tricrômico de Masson.

5.1. ANIMAIS

Para tal, foram utilizadas carcaças de ratos Wistar (Macho e Fêmea) destinados ao descarte, todos já eutanasiados e doados pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde, por isso não foi preciso passar pelo Comitê de Ética. Deste modo, nenhum animal foi criado e sacrificado especificamente para esta pesquisa.

5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os protocolos da plastinação utilizados neste estudo aconteceram em temperatura ambiente (20 a 25°C), realizaram-se segundo o método modificado de von Hagens (1987) e foi constituído basicamente por quatro etapas: fixação, desidratação, impregnação e cura, as quais foram precedidas pela dissecação anatômica.

Durante a dissecação, os ratos foram eviscerados e toda pele e tela subcutânea foram removidas, evidenciando toda a musculatura superficial. A cabeça e a cauda também foram retiradas e descartadas. Para evitar o uso excessivo de insumos químicos e animais, dividiu-se cada carcaça em seis partes, com as quais constituíram os grupos do protocolo experimental (**Figura 25**).

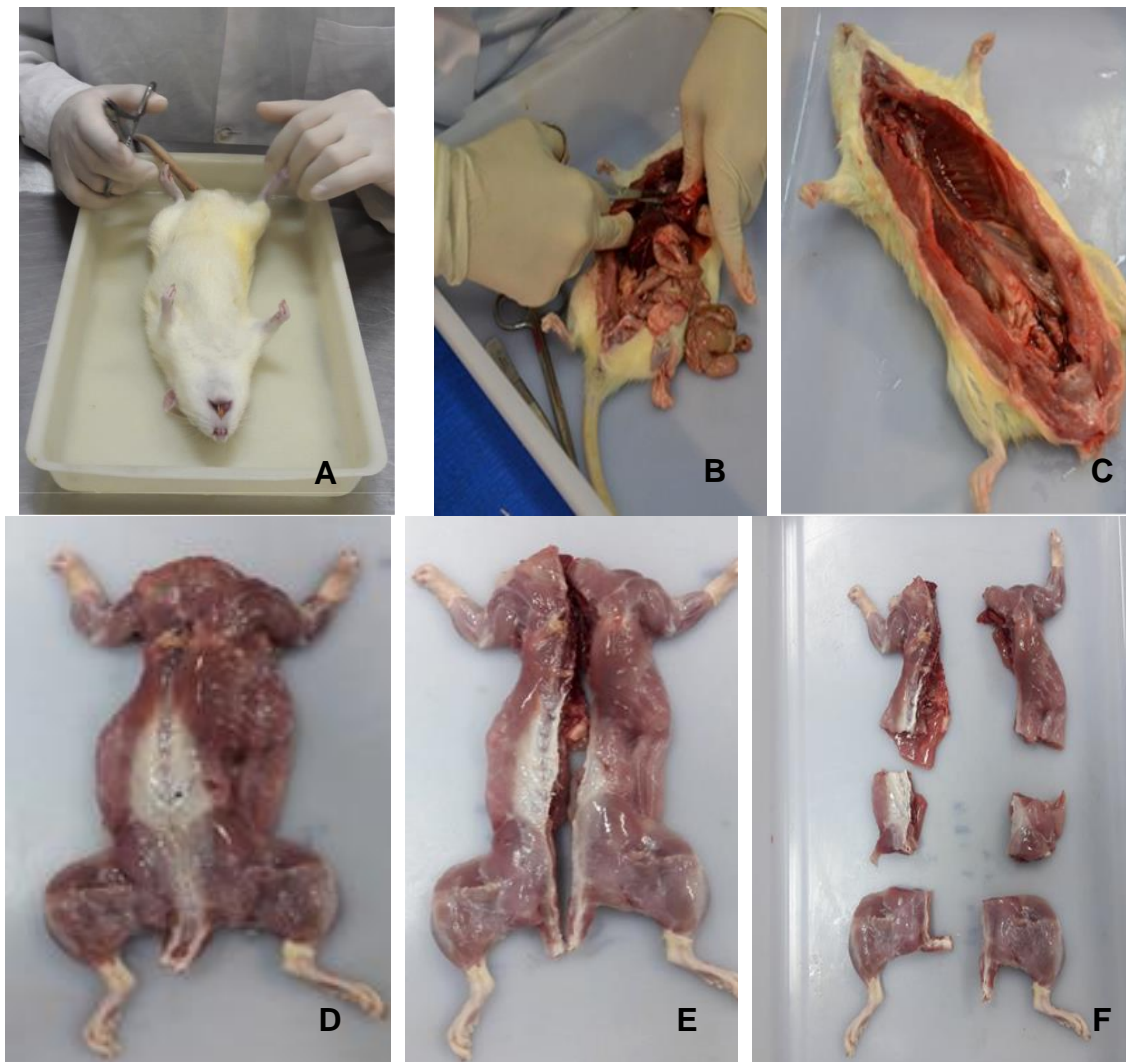


Figura 25 – A – Início da dissecação; B – Procedimento de Evisceração; C – Carcaça eviscerada; D – Musculatura superficial exposta; E e F – Divisão da Carcaça
Fonte: (Acervo do Projeto).

5.2.1. Etapas da Plastinação

5.2.1.1. Fixação

Após a dissecação e antes da desidratação, os espécimes foram submetidos à fixação junto aos corantes testados (Controle, Floxina B, Safranina, Fucsina Fenicada e Tricrômico de Masson) com solução de formaldeído 10% tamponado, onde permaneceram submersos por 30 dias, tempo este escolhido devido à realização de vários testes, sendo esse o que obteve melhor resultado para aderência do corante no músculo;

5.2.1.2. Desidratação

Posteriormente a fixação, os espécimes foram submetidos a quatro banhos sucessivos de acetona com concentração 100% por sete dias cada banho (**Figura 26**). Esta etapa tem o objetivo de remoção da água e gordura, as quais são substituídas pelo solvente orgânico utilizado. Ao final da desidratação a concentração de água no banho foi igual ou inferior a 1%. As concentrações da acetona foram medidas semanalmente com o auxílio de um acetônômetro (**Figura 27**) calibrado para 20°C.



Figura 26 – Desidratação em acetona de espécimes previamente fixados e em contato ou não com os corantes testados (Floxiina B, Controle, Fucsina Fenicada, Safranina e Tricrômico de Masson) – da esquerda para direita.

Fonte: (Acervo do Projeto).



Figura 27 – (A). Acetonômetro (B). Medição da concentração da acetona em proveta por meio do acetonômetro.

Fonte: (Acervo do Projeto).

5.2.1.3. Impregnação Forçada

Nesta etapa, os espécimes já desidratados foram submergidos no silicone misturado com o seu reticulante (tetraetilortosilicato – na concentração de 6 a 8% v/v) e submetidos ao vácuo progressivo em uma câmara de vácuo (**Figura 28**). Este processo levou aproximadamente sete dias. A pressão mínima atingida neste trabalho ficou em torno de 10 mmHg. À medida que a pressão na câmara de vácuo é reduzida, a acetona presente no espécime volatiliza-se e formam bolhas que emergem no silicone, e esses vapores de acetona são removidos para a atmosfera pela bomba de vácuo. Ao atingir o vácuo máximo permitido pela bomba, combinado com a ausência de bolhas, a impregnação foi finalizada, quando então, a bomba de vácuo foi desligada. Após isso, aguardou-se 24 horas para o equilíbrio das pressões, e então os espécimes foram retirados da câmara de vácuo e colocados para drenar o excesso de silicone por 48 horas;



Figura 28 – Câmara de vácuo contendo as peças submergidas no silicone em seus respectivos recipientes durante a etapa de impregnação forçada.

Fonte: (Acervo do Projeto).

5.2.1.4. Catalisação (Cura)

Após a impregnação e drenagem dos espécimes, procedeu-se o processo de cura, onde a polimerização do silicone faz o espécime assumir sua forma

definitiva. Nesta etapa, as peças impregnadas com o silicone já previamente misturadas com o reticulador (tetraetilortosilicato), foram pinceladas (**Figura 29**) com o catalisador (de concentração 1% v/v), que é uma mistura orgânica de compostos de estanho: (Dibutil estanho dilaurato (DBTL), Carboxilato de dibutil estanho e Compostos de trialquil estanho). O tempo de cura do silicone foi de sete dias.



Figura 29 – Aplicação de catalisador químico DBTL para cura do silicone após a impregnação
Fonte: (Acervo do Projeto).

Depois da etapa de catalisação finalizada, realizaram-se cortes sagitais nos espécimes com o intuito de se observar se os colorantes coraram o tecido muscular internamente (região mais profunda).

5.2.2. Grupos Experimentais para coloração

Os grupos experimentais foram montados de acordo com os quatro compostos corantes: Floxina B, Safranina, Fucsina Fenicada, Tricômico de Masson e o grupo controle (sem a presença de corante) (**Figura 30**).

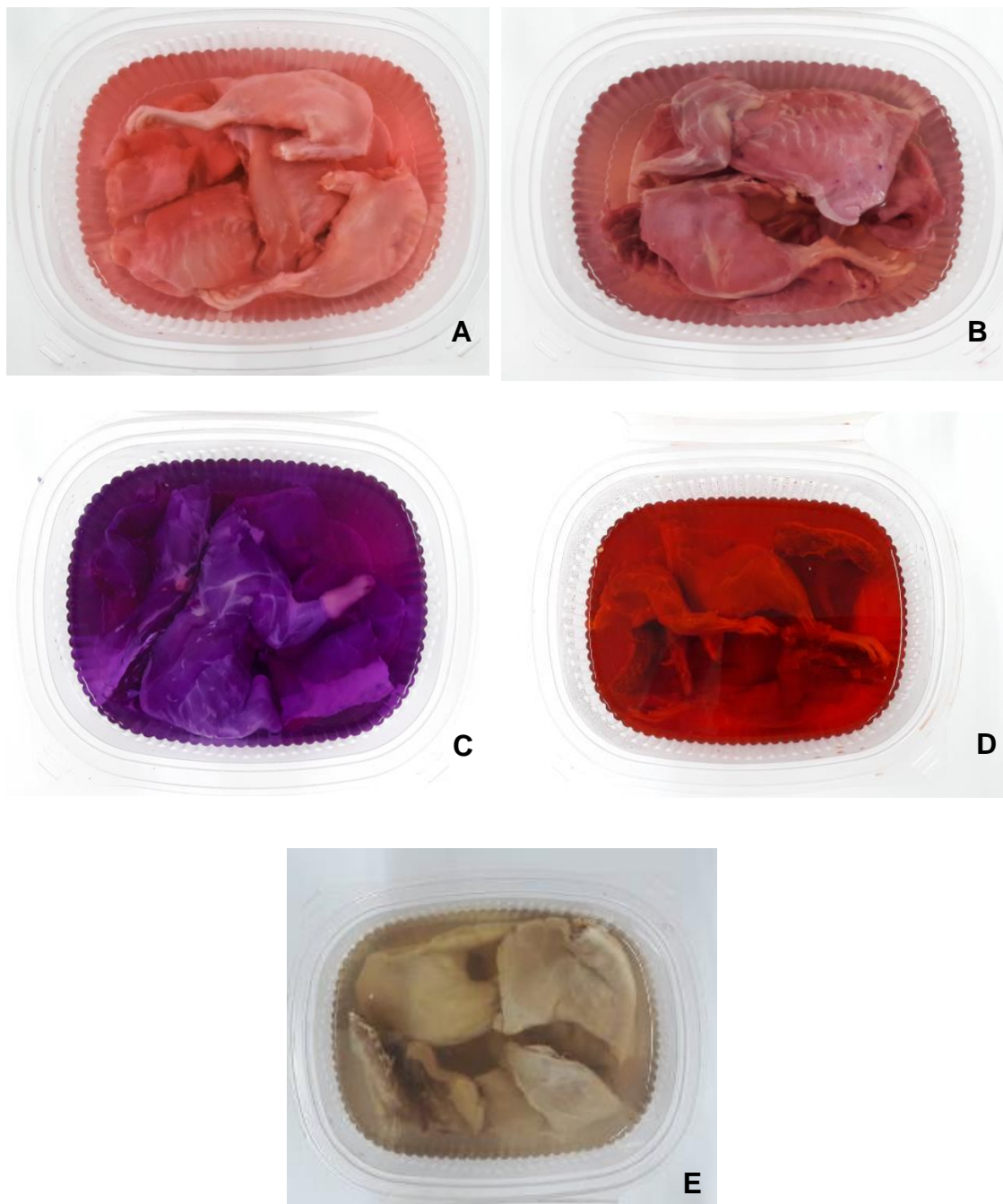


Figura 30 – Grupos experimentais com seus referentes corantes e o controle: **(A)** – FloxinaB; **(B)** – Safranina; **(C)** – Fucsina Fenicada; **(D)** – Tricômico de Masson e **(E)** – Grupo controle.

Fonte: (Acervo do Projeto).

Em cada grupo experimental, foi utilizado seis partes da carcaça dos ratos de acordo com o momento de exposição ao composto testado ou não: na **fixação** os espécimes foram expostos às soluções fixadoras com os respectivos

corantes de cada grupo da seguinte maneira: para as peças coradas com Floxina B, foram utilizados 0,0051 gramas de corante em 300 mL de formaldeído a 10% (solução com concentração de $2,048 \times 10^{-5}$ mol/L), já nas peças coradas com Tricômico de Masson, foi utilizado 7,5 mL da solução colorante em 292,5 mL de formaldeído a 10% (concentração de cada corante na solução: Ponceau 2R – $1,52 \times 10^{-2}$ mol/L; Fucsina Ácida – $5,69 \times 10^{-3}$ mol/L e Orange G – $1,47 \times 10^{-2}$ mol/L), para as peças coradas com a Fucsina Fenicada, utilizou-se 7,5 mL do corante em 292,5 mL de formaldeído a 10 % (concentração do corante Fucsina Básica na solução – $5,23 \times 10^{-5}$ mol/L) e por último, às peças que foram coradas com a Safranina, utilizou se 0,0060 gramas de corante em 300 mL de formaldeído a 10% (solução com concentração de $5,700 \times 10^{-5}$ mol/L) (**Tabela 2**). No grupo controle, não houve exposição dos espécimes a nenhum tipo de corante, apenas foram fixados com 300 mL de formaldeído a 10%.

Antes das peças serem submetidas à etapa de fixação com os seus respectivos corantes, cada corte das peças realizado na dissecação, foi pesado e no final obteve-se um valor médio dos pesos das carcaças de 25,76 gramas, com desvio padrão de 8,76 gramas.

Tabela 2 – Parâmetros de saturação, concentração e percentuais dos respectivos corantes utilizados.

Corante utilizado	Saturação do corante (m/v)	Concentração utilizada (mol/L)	Porcentagem* (m/v)
Floxina B	1,2%	$2,048 \times 10^{-5}$ mol/L	0,14%
Safranina	4,5%	$5,700 \times 10^{-5}$ mol/L	0,04%
Fucsina Fenicada	0,25%	$5,23 \times 10^{-5}$ mol/L	0,70%
Tricômico de Masson (Ponceau 2R, Fucsina ácida e Orange G)	Ponceau 2R – 0,1%; Fucsina ácida – 0,4%; Orange G – 0,8%	Ponceau 2R – $1,52 \times 10^{-2}$ mol/L; Fucsina ácida – $5,69 \times 10^{-3}$ mol/L; Orange G – $1,47 \times 10^{-2}$ mol/L	Ponceau 2R – 666,6% Fucsina ácida – 83,3%; Orange G – 83,3%

* Porcentagem calculada a partir da saturação do corante utilizado

A exposição às soluções fixadoras com ou sem os corantes escolhidos, foi feita através da imersão.

5.2.3. Análise Histológica

Para averiguar em quais regiões das células dos tecidos (muscular esquelético, adiposo e pele) os diferentes corantes de interesse teriam afinidade, retirou-se com o auxílio de um bisturi, uma pequena porção destes tecidos (do grupo controle apenas dissecado), conforme exemplificado na **figura 31**, para então submeter essas amostras as seguintes etapas: fixação em solução de formaldeído a 10% por três dias, seguido pela etapa de desidratação em solução alcóolica a 70%, após a qual se iniciava o processo para a confecção de lâminas histológicas.

Como os materiais eram diferentes, cada amostra foi submetida a um protocolo para a realização dos cortes histológicos conforme, descritos na literatura (TOLOSA *et al.*, 2003), porém na parte das colorações houveram modificações por adequação de cada corante.

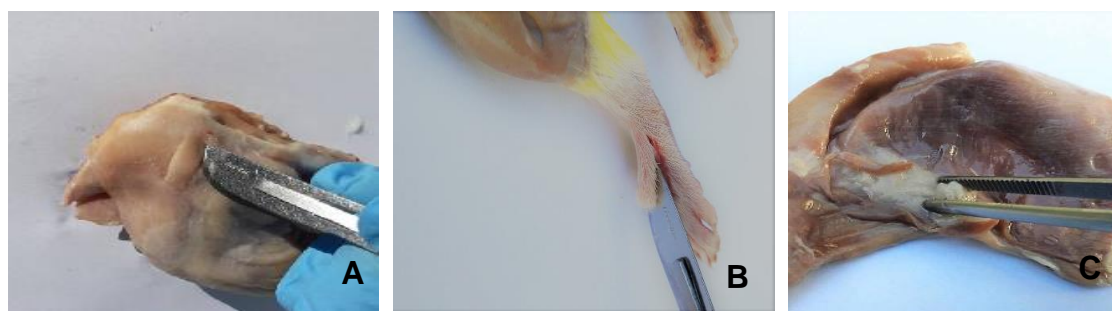


Figura 31 – Método de retirada das amostras para serem submetidas a análise histológica: **(A).** Músculo Estriado Esquelético; **(B).** Pele e **(C).** Tecido Adiposo
Fonte: (Acervo do Projeto).

O processamento do tecido adiposo foi realizado na seguinte ordem: 30 minutos em álcool 80% e depois em álcool 90%, em seguida, o tecido foi embebido em três banhos de álcool 100% (absoluto). Tudo isso no tempo de 30 minutos em cada reagente citado respectivamente. Após essa passagem pelo álcool em diferentes concentrações, o tecido foi submerso durante 15 minutos

em uma mistura de álcool absoluto com xilol 100% na proporção de 50% cada, três banhos em xilol 100% no tempo de 20 minutos cada banho e em seguida passou-se a amostra para a parafina I durante 30 minutos e depois mais 30 minutos em parafina II. Este processamento teve um tempo total de 4 horas e 45 minutos.

Para o processamento do tecido muscular esquelético, foi utilizado um protocolo padrão, realizado da seguinte maneira: após a etapa de fixação em formaldeído a 10% e em álcool 70%, o músculo foi embebido em álcool 80%, álcool 90%, em três banhos de álcool 100% e em uma mistura de álcool absoluto com xilol 100% na proporção de 50% cada. Depois de passar por diferentes concentrações de álcool, a amostra foi submersa em três banhos de xilol 100%, após isso, o tecido foi posto em parafina I e parafina II. O tecido ficou submerso durante 60 minutos em cada reagente citado acima respectivamente, totalizando o processo com duração de 11 horas.

Já o processamento da amostra de pele se deu da forma a seguir: 50 minutos em álcool 80% e em álcool 90%, seguido por três banhos de álcool 100% no tempo de 60 minutos cada banho e depois em uma mistura de álcool absoluto com xilol 100% na proporção de 50% cada, também por 60 minutos. Logo após, a amostra de pele foi embebida em três banhos de xilol 100% no tempo de 30 minutos cada banho, seguido por 60 minutos em parafina I e 30 minutos em parafina II. Após essa bateria de reagentes, cada amostra foi colocada na parafina III por 30 minutos e finalmente emblocadas na parafina IV para assim fazer os cortes no micrótomo.

Para o preparo das lâminas histológicas, os cortes foram feitos na espessura de 5µm, utilizando o micrótomo manual (Leica Biosystems, Germany). Os cortes foram capturados em lâminas de vidro para serem corados e analisados.

Com os cortes das amostras já posicionados em cada lâmina, deu-se início a etapa de desparafinização (pré-coloração) para posterior exposição dos tecidos aos corantes. Processo este que foi realizado da seguinte maneira: As lâminas foram submetidas a banhos separados de 3 minutos cada em: três banhos de xilol 100%, mistura de álcool absoluto com xilol 100% na proporção

de 50% cada, dois banhos de álcool 100% e um banho em álcool 96%. Em seguida as lâminas com os cortes ficaram expostas a um pequeno fio de água corrente durante 5 minutos para retirar o excesso de xilol da etapa anterior. Dessa maneira, as peças ficaram prontas para a etapa de coloração (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Esquema de coloração das amostras para realização da análise histológica.

PELE	GORDURA	MÚSCULO
Fucsina Fenicada	Fucsina Fenicada	Fucsina Fenicada
Safranina	Safranina	Safranina
Floxina B	Floxina B	Floxina B
Tricômico de Masson	Tricômico de Masson	Tricômico de Masson

Na etapa de coloração, cada lâmina ficou em contato com seu respectivo corante por sete dias em cubas de vidro (**Figura 32**) e depois disso, as lâminas foram lavadas em água para retirar o corante excedente. Logo após, foi executada o processo de pós-coloração da seguinte maneira: banhos individuais de 1 minuto com álcool 96%, dois banhos em álcool 100%, mistura de álcool absoluto com xilol 100% na proporção de 50%. Por último, três banhos de xilol 100% de 3 minutos cada.

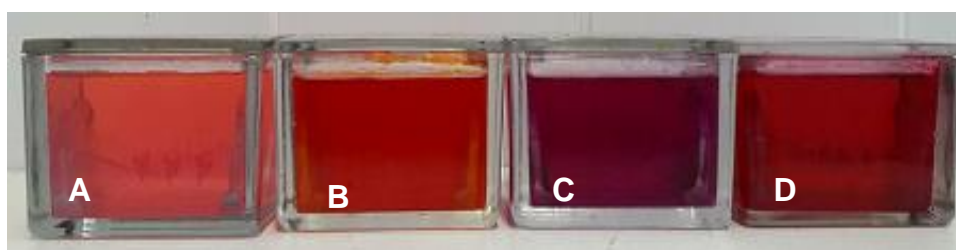


Figura 32 – Etapa de coloração dos cortes utilizados: **(A)** – Floxina B; **(B)** – Tricômico de Masson; **(C)** – Safranina e **(D)** – Fucsina Fenicada.

Fonte: (Acervo do Projeto).

Depois da montagem das lâminas (montagem realizada aplicando-se o p-xylene-bis-N-pyridinium bromide – DPX em lamínulas e aplicando em cima dos cortes sobre as lâminas de vidro) as mesmas foram analisadas no fotomicroscópio óptico Zeiss acoplado com uma câmera digital (AxioCam

modelo ERc5s acoplada, Zeiss®) e as fotos obtidas foram ajustadas no programa Axion Vision LE64 e vista com aumento de 40x para o registro das estruturas celulares e ou tecidos específicos corados.

5.2.4. Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-VIS

As soluções dos corantes utilizadas para a coloração dos espécimes foram analisadas no espectrofotômetro de absorção com o intuito de ver através do comprimento de onda em que região do espectro o corante absorve luz. As soluções foram analisadas na concentração de 5×10^{-6} mol/L, pois a solução de Fucsina Fenicada foi diluída a esta concentração para conseguir fazer a análise no espectrofotômetro, então, como padronização, deu-se preferência de fazer as análises dos outros corantes nessa mesma concentração. O preparo das soluções foi feito em água de torneira, visto que, os espécimes foram corados em formaldeído com água de torneira. As análises foram realizadas no espectrofotômetro UV-VIS (ultra violeta - visível) VARIAN, modelo: CARY 50 com leitura na faixa de 200 a 800 nm.

Devido à característica de emissão de fluorescência do corante Floxina B, foi realizada a espectroscopia de fluorescência deste corante também na concentração de 5×10^{-6} mol/L. Esta análise foi feita no espectrofotômetro de fluorescência da Agilent Technologies Cary Eclipse, com leitura na faixa de 522 a 700 nm, sendo que a molécula do corante foi excitada em 519 nm.

Para estudar a degradação destes corantes sob a ação da luz, as soluções foram feitas nessa mesma concentração ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/L) e deixadas em balões volumétricos expostos à luz de lâmpadas fluorescentes tubulares com potência de 40 w distantes 155 cm, durante nove dias. Antes da exposição à luz, tirou-se uma alíquota de cada solução colorante e guardou-se em recipiente âmbar coberto com papel alumínio longe do alcance da luz (controle) por nove dias. Sucederam-se então as análises no espectrofotômetro de absorbância molecular UV-VIS e no de fluorescência (apenas a solução de Floxina B, com excitação da molécula em 519 nm) com as alíquotas controle e com as que foram expostas a energia luminosa para determinar a degradação ou não pela ação da

luz. As soluções controle foram analisadas no espectrofotômetro no mesmo dia das análises das soluções expostas à luz.

Resultados e Discussão

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. ESPÉCIMES CORADOS

6.1.1. Espécimes corados com Floxina B

No âmbito desta pesquisa, um dos espécimes que foi corado e plastinado com a Floxina B, é mostrado na **figura 33**.



Figura 33 – Espécime plastinado previamente corado com Floxina B.
Fonte: (Acervo do Projeto).

No caso da molécula de Floxina B, Dapson (2005) nos revela que a interação entre este corante e o tecido biológico estudado, é através de Forças de Van der Waals do tipo dipolo induzido, mais precisamente pela polarização da nuvem de elétrons dos halogênios da molécula do corante, produzindo assim uma carga parcial que então é mantida no campo adjacente de carga oposta do tecido.

A **figura 34** mostra um comparativo de peças plastinadas: uma corada com a Floxina B e outra sem adição de colorante (controle).



Figura 34 – Comparação entre uma peça plastinada e corada com Floxina B (à esquerda) e uma peça plastinada sem corante (à direita).

Fonte: (Acervo do Projeto).

A cor, segundo Araújo (2004), é um fator que influencia significativamente a aceitabilidade de produtos de uma maneira em geral. No caso das peças coradas, consegue-se ver uma melhor diferenciação entre a fáscia e o tecido muscular, valorizando assim mais a peça. Já a peça sem nenhuma espécie de coloração, possui um aspecto opaco e distante da cor natural do tecido, não evidenciando os diferentes tecidos presentes, tão relevantes para o estudo anatômico. Já nas peças que foram coradas com a Floxina B consegue-se observar uma distinção entre músculo e tecido conjuntivo, ou seja, puderam ser evidenciados os tendões (**Figura 35**) na sua cor natural. O músculo teve a sua cor valorizada pelo corante e até mesmo deixando a fáscia em evidência.

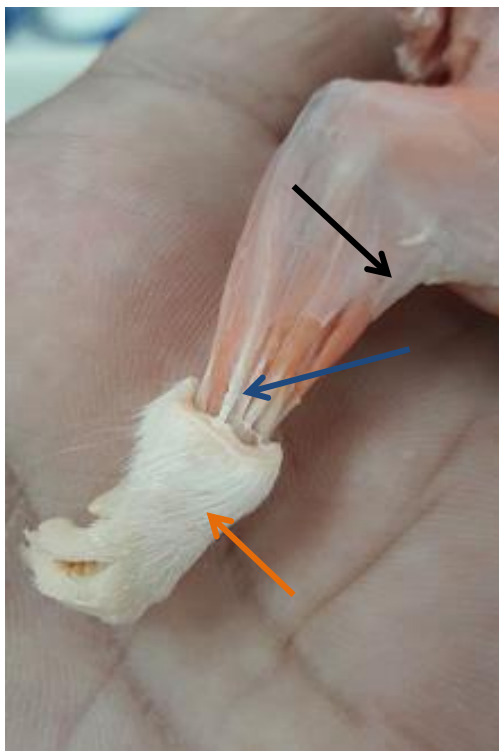


Figura 35 – Tendão (seta azul), Fáscia (seta preta) e Pele (seta laranja) em evidência, mostrando que não foram tingidos pelo corante.
Fonte: (Acervo do Projeto).

Como visto na **figura 35**, a Floxina B na concentração que foi utilizada não tingiu a pele, nem tendão e nem fáscia, mostrando assim que não houve interação entre estas estruturas com o corante.

De acordo com Veuthey *et al.* (2014), a Floxina B pode ser adicionada para um aprimoramento de cor na técnica de coloração com Eosina por apresentarem o mesmo grupo cromóforo, sendo que na estrutura de ambas as moléculas, apresentam o íon enolato (**Figura 36**) em comum, caracterizando assim como um corante ácido. Como as duas estruturas apresentam o mesmo grupo cromóforo e grupos auxócromos semelhantes, a eosina não é utilizada para identificação de tendão (de acordo com protocolos de histologia) e consequentemente a Floxina B também não é utilizada para essa finalidade. Em via deste argumento, pode-se considerar o fato de que a Floxina B só desempenhou o papel de corar tecido muscular esquelético.

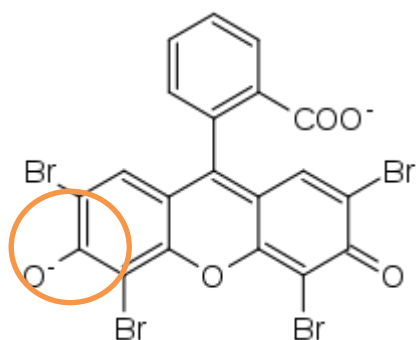


Figura 36 – Estrutura Molecular da Eosina evidenciando o íon enolato.

Por último, depois do corte transversal realizado no espécime (**Figura 37**), percebeu-se também que como resultado final desta coloração, a molécula da Floxina B só corou o tecido superficialmente, fazendo assim, interação com as proteínas da superfície do tecido.

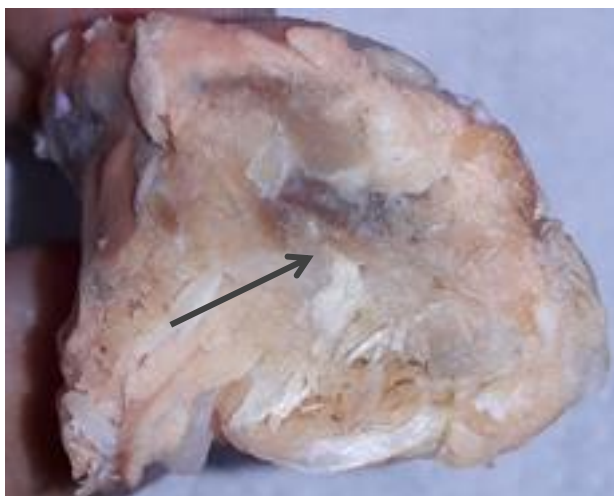


Figura 37 – Corte sagital do músculo corado mostrando o interior não tingido pelo corante (seta).

Fonte: (Acervo do Projeto).

Isso aconteceu, provavelmente, devido ao fato de que a interação que ocorreu entre a molécula do corante e o tecido muscular foi uma atração eletrostática, ou seja, foi justamente por interação entre as cargas opostas de ambos e fazendo assim com que o corante fique somente na superfície e não interagindo com o interior do tecido. Mostrou-se assim que este corante não é permeável em tecido muscular.

6.1.2. Espécimes corados com Safranina

Dos espécimes que foram corados com a Safranina e depois plastinados, pode-se ver uma peça já finalizada na **figura 38**.



Figura 38– Espécime plastinado previamente corado com a Safranina.

Fonte: (Acervo do Projeto).

Segundo Veuthey *et al* (2014), corantes catiônicos, sofrem um fenômeno chamado metacromasia, que é uma característica de células ou componentes dos tecidos de alterar cor original do corante, fazendo assim com que a coloração fique com uma cor diferente da que deveria ser. Devido a este fato, embora a solução de safranina possua coloração roxa, as peças assumiram um tom mais claro de vinho.

Feito um corte transversal no músculo esquelético do espécime corado, notou-se que a Safranina conseguiu penetrar bem em todo o tecido muscular (**Figura 39**), não se limitando apenas à superfície das peças. Isso provavelmente ocorre devido ao tamanho de sua molécula que é relativamente pequena perto dos outros corantes, e assim, facilita a sua passagem pelo interior do tecido.



Figura 39 – Corte Transversal do músculo evidenciando a coloração interna com Safranina (seta branca).
Fonte: (Acervo do Projeto).

Corroborando este resultado, Cao (1998) conclui que existe uma ligação eletrostática entre a Safranina e o DNA. Presumivelmente, é por ser atraído pelas cargas negativas do ácido nucleico que a Safranina foi intercalada no interior da dupla hélice do DNA e por ligação eletrostática de acordo com a **figura 40**.

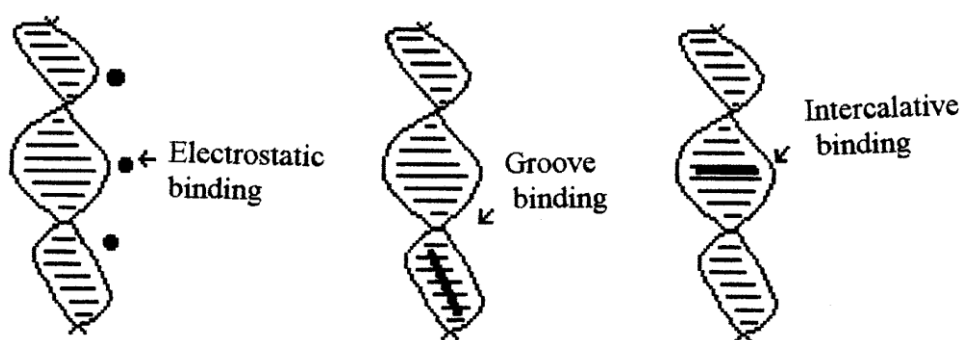


Figura 40 – Modos de ligação de moléculas pequenas com o DNA.
Fonte: (CAO, 1998).

Em relação às peças coradas com Safranina, conseguiu-se observar uma melhor diferenciação das estruturas do tecido do que os espécimes sem coloração (**Figura 41**). Além disso, pode-se observar também, de uma maneira mais evidente, a diferenciação entre o tecido muscular e a fáscia.

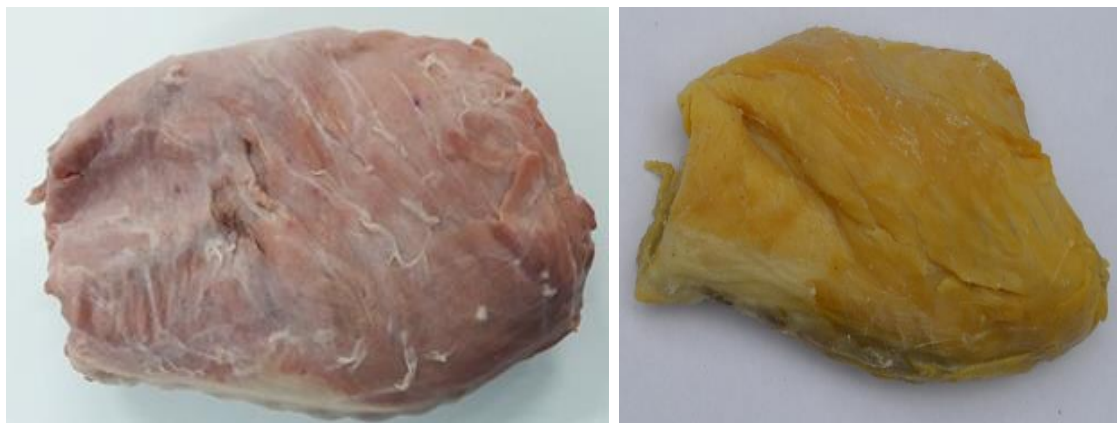


Figura 41 – Comparativo entre espécimes plastinados, corado com Safranina (esquerda) e sem corante (direita).
Fonte: (Acervo do Projeto).

Analizou-se também a distinção entre o tendão e tecido conjuntivo entre o músculo da peça que foi corada e obtivemos o seguinte resultado (**Figura 42**).

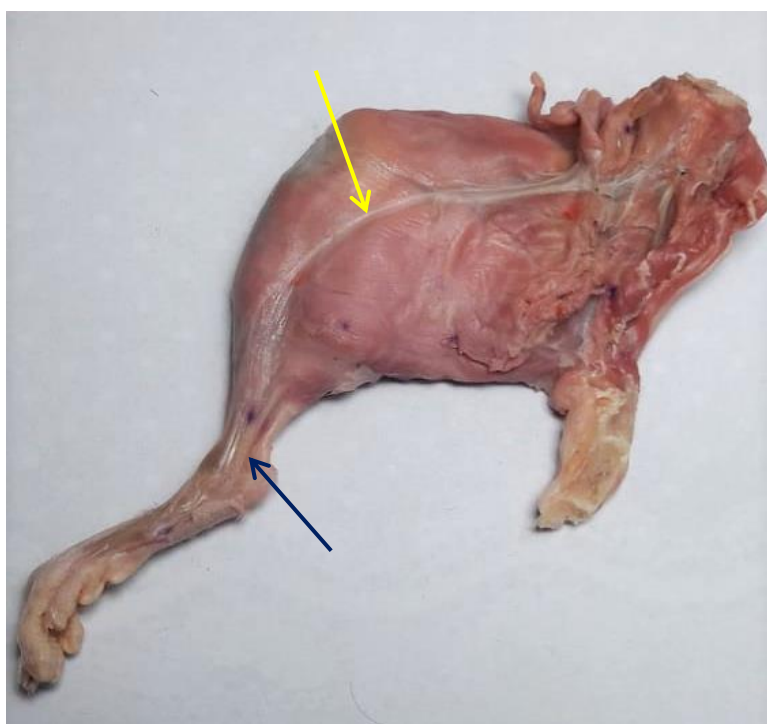


Figura 42 – Peças coradas com Safranina e mostrando em evidências estrutura como: Tecido Conjuntivo (seta amarela) e Tendão (seta azul).
Fonte: (Acervo do Projeto).

Na concentração do corante que foi utilizada, não houve tingimento de tendões e tecido conjuntivo, pois não ocorreu uma interação significativa entre a molécula do colorante utilizado com os componentes biológicos de cada estrutura, corando apenas o tecido muscular (**Figura 42**).

Horobin (2011) nos revela que os cátions do corante permutam entre os cátions inorgânicos móveis para neutralizar os íons negativos fixos nos biopolímeros tais como DNA, RNA e glicosaminoglicanos ácidos. Este modelo é responsável por ambas às afinidades, e que é regido por um processo de entropia e seletividade, que neste caso depende das cargas fixas dos biopolímeros dos tecidos, uma vez que a neutralidade elétrica entre o tecido e o corante disperso em solução deve ser mantida.

No caso do não tingimento do tendão e tecido conjuntivo, pode se levar em consideração a essa não neutralidade às cargas das estruturas destes tecidos com a molécula do corante. Horobin (2011) ainda ressalta que tal quadro de troca iônica para manter a neutralidade também pode ser explicado pelos efeitos do pH perante a absorção do corante pelo tecido, fato este que pode ser levado em conta também para a não coloração dessas estruturas, já que o pH em que as peças foram coradas estava em torno de 6,5, ou seja, certas estruturas do espécime não foram coradas justamente porque o pH em que os mesmos foram expostos não proporcionou a neutralidade entre as cargas.

6.1.3. Espécimes corados com Fucsina Fenicada (Carbolfucsina)

Dos espécimes que foram corados com a solução de Fucsina Fenicada, pode ser visto o produto finalizado na **figura 43**.



Figura 43 – Espécime corado com a Fucsina Fenicada evidenciando a diferença entre fáscia (seta vermelha), tecido muscular (seta cinza) e pele (seta azul).

Fonte: (Acervo do Projeto)

Pela estrutura da Fucsina Básica conter cátions de nitrogênio, este corante é caracterizado como corante catiônico e por isso, também sofre do processo de metacromasia causado pelos tecidos biológicos. Prova disso, pode ser confirmado pelo fato de a solução da Fucsina Fenicada (que contem a Fucsina Básica) ter uma tonalidade para o vinho e as peças que foram coradas com essa solução, fiquem roxas.

Horobin (2011) disserta que o tingimento do corante ácido ou básico não é apenas troca iônica, mas normalmente envolve outros fenômenos que contribuem para a afinidade do corante – biopolímero (o tecido em questão). Devem-se levar em consideração três possibilidades: Primeiro, pode haver forças atrativas entre o biopolímero e o corante, como aquelas que ocorrem entre os anéis aromáticos polarizáveis dos corantes e das bases nitrogenadas de ácidos nucleicos. Em segundo lugar, os efeitos hidrofóbicos que surgem no meio aquoso quando o corante e o tecido biológico apresentam regiões hidrofóbicas e assim essas regiões podem entrar em contato. Ambos os processos estão envolvidos na ligação do corante que está relacionado com a inserção de corantes catiônicos entre os pares de bases da dupla hélice do DNA (“intercalação”) e por último, uma contribuição para a afinidade corante-biopolímero pode ser a formação de complexos corante-corante tal como ocorre com a metacromasia.

A Fucsina Fenicada, como no caso da Floxina B, ficou aderida somente na superfície do espécime (**Figura 44**), que provavelmente se deva ao complexo que é formado pela metacromasia, como foi colocado por Horobin (2011), impedindo assim do corante ir para o interior do tecido.

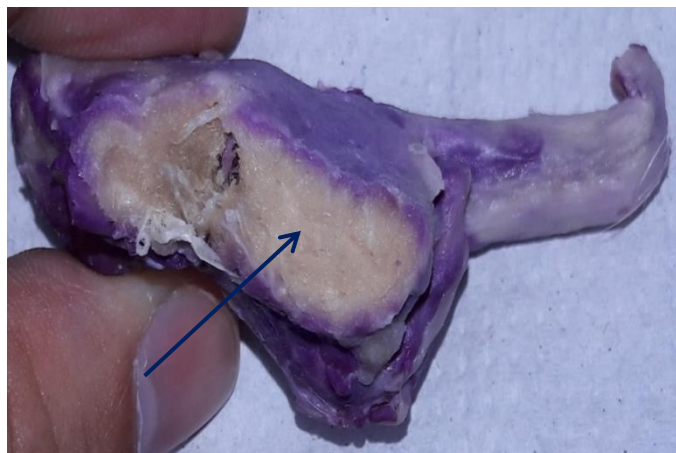


Figura 44 – Peça em corte sagital pós-coloração e plastinação, mostrando que o tingimento se deu apenas na superfície da peça. Interior não corado.
Fonte: (Acervo do Projeto)

A partir desse corante, também foi obtido um excelente contraste, com uma satisfatória diferenciação entre diferentes estruturas do espécime como: tendão, pele, fáscia e tecido conjuntivo, as quais ficaram mais destacadas em relação ao espécime que não apresenta nenhum tipo de corante (**Figura 45**).



Figura 45 – Comparação entre uma peça plastinada e corada com Fucsina Fenicada (à esquerda) e uma peça plastinada sem corante (à direita).
Fonte: (Acervo do Projeto).

Por se tratar também de um corante básico (como no caso anterior) e por deixar em sem tingimento o tendão e a pele, pode se concluir que ocorreram os

mesmos fatores envolvidos na coloração com a Safranina, ou seja, a não neutralidade entre as estruturas dos tecidos com a molécula do corante (HOROBIN, 2011).

6.1.4. Espécimes corados com Tricrômico de Masson

Por último, na **figura 46** pode se observar um espécime que foi corado com a solução de Tricrômico de Masson e já plastinado.

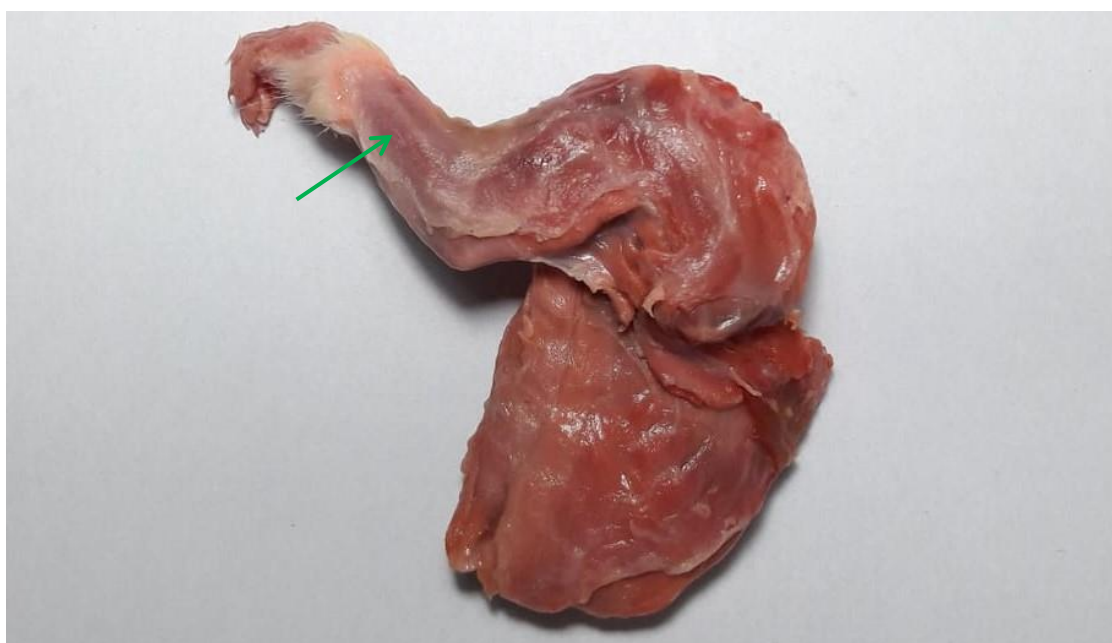


Figura 46 – Espécime plastinado previamente corado com a solução de Tricrômico de Masson, evidenciando a diferença entre músculo e fáscia (seta verde).

Fonte: (Acervo do Projeto).

De todos os corantes utilizados até agora, o resultado obtido com o Tricrômico de Masson foi o que mais se aproximou da tonalidade real de um tecido muscular esquelético (**Figura 46**), resultando em uma tonalidade vermelha bastante intensa.

Na coloração com o Tricrômico de Masson, pôde-se observar uma melhor distinção entre músculo, fáscia e tecido conjuntivo. Corroborando dados da literatura, que mostram a aplicação rotineira deste corante em laboratórios de histologia para destacar tecido conjuntivo e também músculo, neste estudo o corante não interagiu com os biopolímeros do tecido conjuntivo (incluindo a

fáscia) (Figura 46), isso provavelmente deve-se ao fato de que não houve uma neutralidade entre as cargas do tecido e dos corantes, promovendo assim a não interação e não coloração do tecido (HOROBIN, 2011).

Com relação os espécimes corados com o Tricrômico de Masson, conseguiu-se visualizar mais estruturas do tecido muscular do que o espécime sem corante (**Figura 47**) e alegando que a cor do tecido muscular corado apresentou uma maior verossimilhança com o tom natural do músculo.



Figura 47 – Comparação entre um espécime plastinado previamente corado com Tricrômico de Masson (à esquerda) e um espécime plastinado sem corante (à direita).

Fonte: (Acervo do Museu).

Os resultados mostraram que também houve absorção do corante pelo tecido muscular esquelético, ou seja, as fibras musculares do interior do espécime, também ficaram coradas (**Figura 48**). Segundo Bancroft e Stevens; Moral (2002; 1993 *apud* FERRO *et al.*, 2006), o princípio da coloração pelo Tricrômico de Masson, é firmado na diferença de permeabilidade que existe entre as fibras do colágeno e os outros componentes do tecido em questão, ou seja, a solução do Tricrômico de Masson apresenta capacidade de entrar no interior do tecido muscular e devido a isso, existe uma diferença de coloração em relação à outras estruturas do tecido causada por essa permeabilidade. Adicionalmente, quando as estruturas proteicas do tecido estão expostas ao

formol, ocorrem interações entre essas estruturas promovendo à formação de uma espécie de rede tridimensional insolúvel, com isso as proteínas do músculo produzem esta rede de maneira bem densa com pequenos poros entre essas estruturas proteicas. Dessa forma, as moléculas pequenas do corante conseguem penetrar no tecido e promover o seu tingimento.

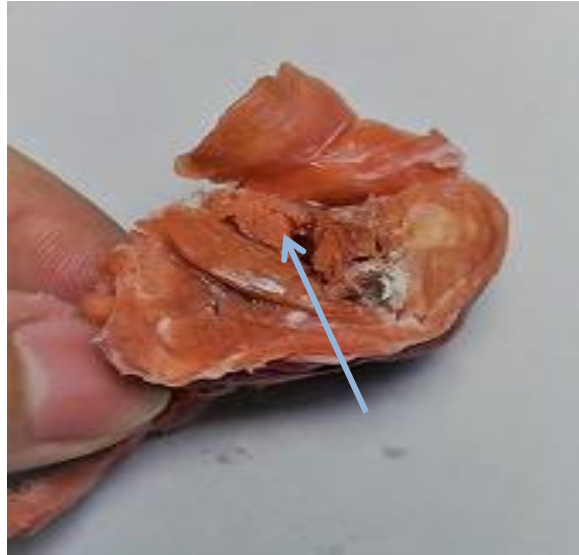


Figura 48 – Corte sagital do músculo esquelético evidenciando a coloração interna com Tricrômico de Masson.
Fonte: (Acervo do Projeto).

Em resumo, de acordo com a **tabela 4**, puderam-se levantar algumas vantagens e desvantagens dos corantes utilizados para a coloração dos espécimes.

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens dos corantes utilizados na pesquisa para a coloração dos espécimes.

Corante utilizado	Vantagens	Desvantagens
Floxina B	Corou o tecido muscular e deixou em evidência a fáscia, tendão e a pele.	A interação das cargas do corante com o tecido muscular foi de maneira superficial fazendo assim que a coloração foi de maneira superficial, não corando internamente.
Safranina	Corou internamente o espécime e evidenciou estruturas como tecido conjuntivo.	Sofreu processo de metacromasia.
Fucsina Fenicada	Evidenciou estruturas como tecido conjuntivo e não corou a pele	Sofreu processo de metacromasia e não corou internamente o tecido.
Tricrômico de Masson	Deixou o músculo mais próximo da cor natural e evidenciou estruturas como tendão e fáscia.	Solução composta por três corantes, além da adição de ácido acético em sua composição.

6.2. ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS TECIDOS CORADOS

Nesta etapa de nosso estudo analisamos por meio de técnicas utilizadas na histologia, em quais regiões dos tecidos (gordura, pele e músculo) os corantes utilizados conseguiram tingir. Foi dada a preferência por realizar esta etapa da pesquisa com amostras não plastinadas, uma vez que com as peças coradas e plastinadas obteve-se um resultado insatisfatório.

Timm (2005) nos fala a respeito da importância da utilização de corantes para a visualização das estruturas no tecido e que normalmente são utilizados corantes hidrossolúveis, e devido a isso, foi feito uma análise histológica controle (**Figura 49**), que mostrou que sem a presença de corantes não é possível distinguir direito as estruturas.

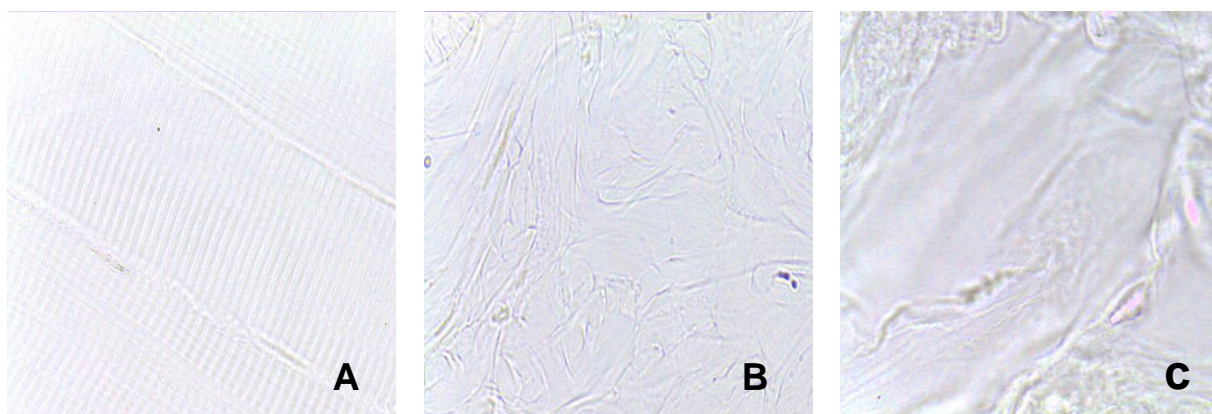


Figura 49 – Imagens de microscopia óptica das amostras de tecidos de rato wistar sem a presença de corantes (espessura de 5 μ m): Músculo Esquelético **(A)**; Pele **(B)** e de Gordura **(C)**
Fonte: (Acervo do Projeto).

A escolha destes tecidos para a análise microscópica do tingimento dos corantes nestes espécimes se deu em função destes tecidos estarem mais expostos durante o processo de coloração.

Com relação ao tecido adiposo, não houve interação de nenhum corante com a gordura. Como pôde ser visto na **figura 50**, todos os corantes ficaram do lado de fora das células dos adipócitos, situados no interstício das células, não sendo assim absorvido pela gordura.

Dapson (2005) mostra que os corantes solúveis em óleos tradicionais utilizados para corar lipídios têm valores de HI (Índice de Hidrofobicidade) superiores a 8,0. Em se tratando dos corantes que foram utilizados na pesquisa, a Floxina B apresenta HI de 5,91, a Safranina com HI de 6,41, solução de Tricrômico de Masson que é composta pelo Orange G (HI= 2,15), pelo Ponceau 2R (HI= 2,41) e pela Fucsina ácida (HI= 1,80) e por último, temos a solução de Fucsina Fenicada (que apresenta como corante a Fucsina Básica) que também apresenta HI abaixo de 8,0. Devido a este argumento e pelas imagens da **figura 50**, pode-se concluir que todos os corantes utilizados apresentam HI inferiores a 8,0 e por isso não apresentou afinidade com os adipócitos.

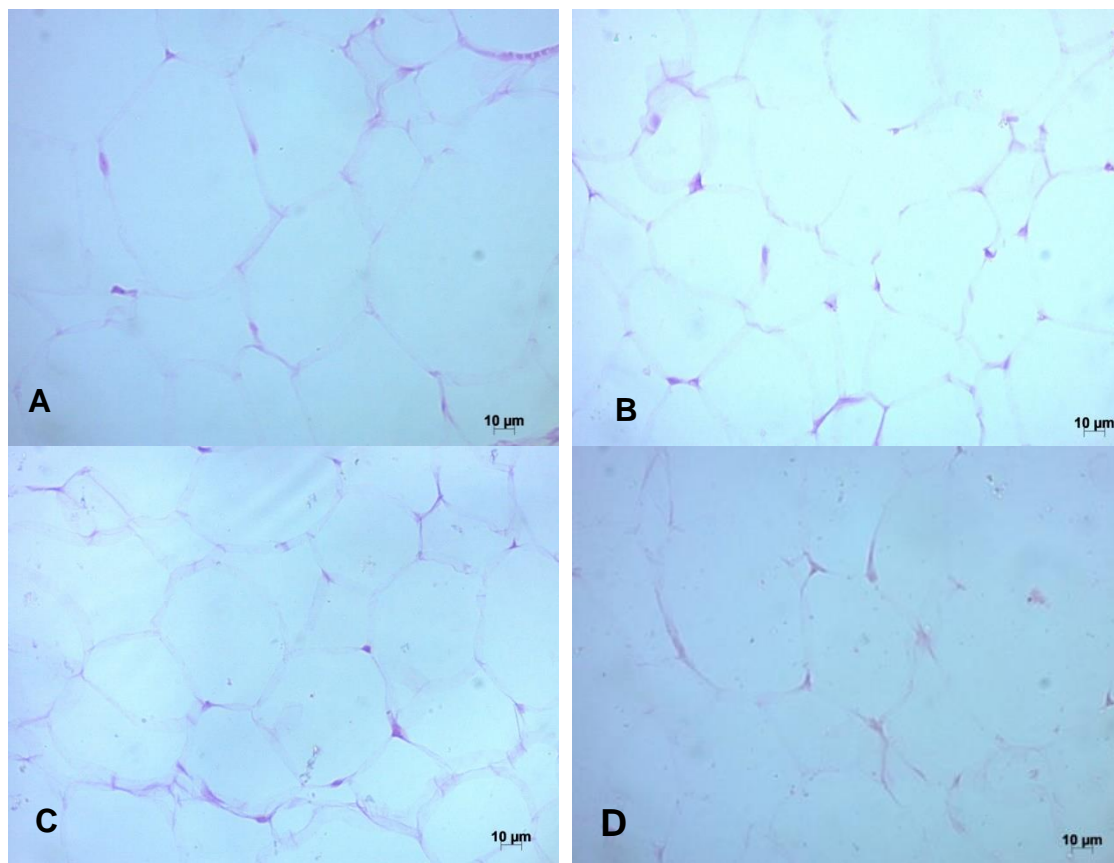


Figura 50– Imagens de microscopia óptica das amostras de gordura, coradas com Floxina B (A); Safranina (B); Fucsina Fenicada (C) e Tricrômico de Masson (D), em cortes com espessura de 5 µm.

Fonte: (Acervo do Museu).

A partir da microscopia do tecido muscular esquelético pode-se notar que todos os corantes tiveram interação com as fibras musculares, realçando suas estruturas. Assim como na macroscopia, as análises microscópicas também mostraram uma coloração mais intensa com os corantes Tricrômico de Masson e Fucsina Fenicada (**Figura 51**), corroborando, a literatura que diz que isso se deve ao fato de ter adição de substâncias ácidas em suas soluções (CHANG, 1994).

Uma vez que não houve a utilização de um contra corante para evidenciar outras regiões do tecido muscular esquelético, não houve a possibilidade de se afirmar a partir das imagens de microscopia, o caráter acidófilo ou basófilo dos corantes, pois todas as fibras do tecido foram coradas igualmente, por isso que houve a necessidade de fazer colorações/análises em outros tecidos, além de avaliar em quais estruturas dos tecidos os corantes se fixaram. Horobin (2011) disserta sobre a neutralidade entre as cargas dos corantes e das proteínas do

tecido para que ocorra a coloração. Em via das condições em que os tecidos biológicos utilizados nesta pesquisa foram corados, pode-se dizer que essa neutralidade entre as cargas foi alcançada.

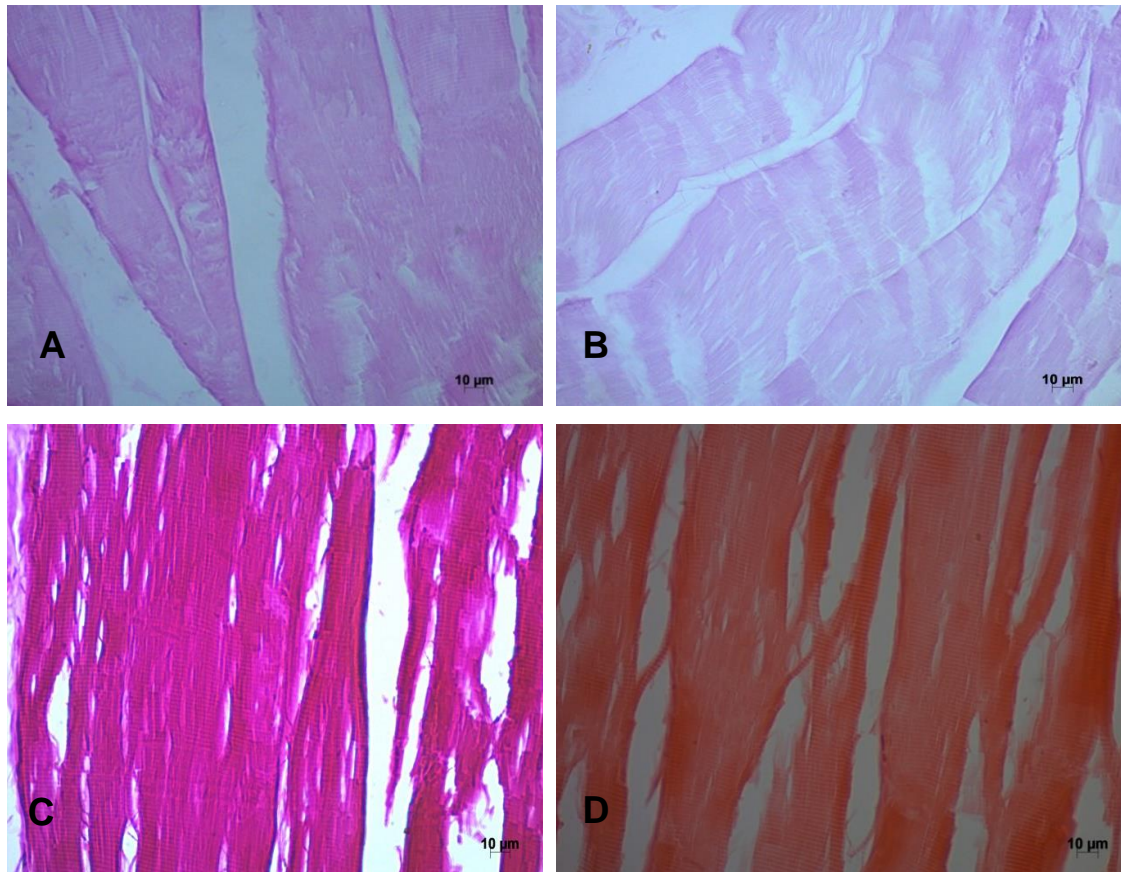


Figura 51 – Imagens de microscopia óptica das amostras de tecido muscular esquelético, coradas com Floxina B (**A**); Safranina (**B**); Fucsina Fenicada (**C**) e Tricrômico de Masson (**D**), em cortes com espessura de 5 µm. **Fonte:** (Acervo do Projeto).

Por último, foram feitas as análises do tecido epitelial que foi igualmente submetido aos quatro corantes de acordo com a **figura 52**.

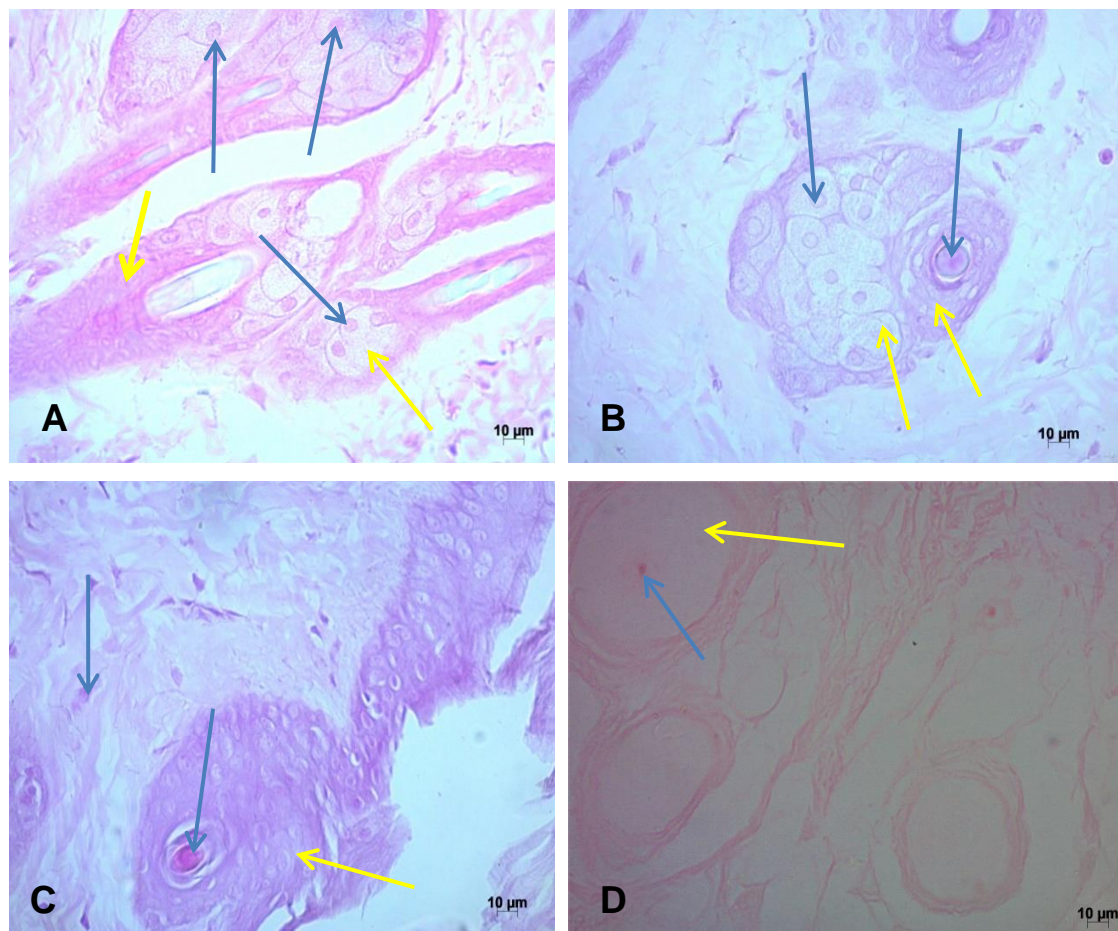


Figura 52 – Imagens de microscopia óptica das amostras de tecido epitelial, coradas com Floxiina B(A); Safranina (B); Fucsina Fenicada (C) e Tricrômico de Masson (D), em cortes com espessura de 5 µm. (setas azuis indicando núcleo e amarelas o citoplasma).

Fonte: (Acervo do Projeto).

Na imagem de microscopia (D), temos a amostra de tecido epitelial que foi corado com o Tricrômico de Masson (coloração do citoplasma) que é composto por três corantes (Fucsina ácida, Ponceau de Xilidina e Orange G), sendo todos estes compostos ácidos, pois apresentam ânions sulfônicos em sua estrutura molecular tendendo a corar estruturas positivamente carregadas. (PRENTO, 2009; DAPSON, 2005).

De forma similar, com a Floxiina B (A), também houve a coloração do citoplasma das células (setas amarelas), pois também se trata de um corante ácido por apresentar grupamento aniônico em sua estrutura (HOROBIN, 2002). Porém na foto da microscopia, pode-se perceber que houve coloração dos

núcleos (apontados com setas azuis) das células tanto coradas com Floxina B quanto coradas com Tricrômico de Masson (**Figura 52**). Por se tratarem de corantes ácidos, isso não era esperado de ocorrer, mas considerando o caráter multiusuário do laboratório, este resultado talvez possa ser explicado por uma eventual contaminação por resquícios de corantes básicos, fazendo assim com que os núcleos ficassem corados (**Figura 52**).

Já na imagem (**C**) da **figura 52**, o colorante utilizado foi a solução de Fucsina Fenicada e apresenta como corante, a Fucsina básica, que por conter grupamentos catiônicos em sua estrutura, caracteriza-se como um corante básico. Corantes básicos demonstram afinidade por estruturas com cargas negativas (VEUTHEY *et al*, 2014) e por este motivo, ocorreu a coloração dos núcleos das células como pode ser vista na **figura 52**. Nesta foto, pode-se notar que os citoplasmas das células também foram corados e isso não era esperado, uma vez que se trata de um corante com carga positiva. Nesse caso, provavelmente também houve contaminação de alguma solução utilizada com resquícios de corante ácido.

Na imagem da microscopia (**B**), temos o tecido epitelial corado pela Safranina, que por se tratar de um corante com cargas positivas, corou estruturas com cargas negativas, como o núcleo das células (**Figura 52**), concordando com a literatura (DAPSON, 2005). A também inesperada coloração citoplasmática observada pode ter sido resultado da contaminação por algum corante ácido que poderia estar nas soluções de Xilol das etapas de pós-coloração.

6.3. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ABSORÇÃO MOLECULAR UV-VIS DOS CORANTES UTILIZADOS

A espectrofotometria baseia-se na absorção de radiação eletromagnética por determinadas funções na molécula, quando os seus elétrons se movimentam entre níveis energéticos. Uma vez que diferentes substâncias têm diferentes padrões de absorção, a espectrofotometria permite, por exemplo, identificar substâncias com base no seu espectro. Permite também quantificá-las, uma vez que a quantidade de luz absorvida está relacionada com a concentração da substância, segundo a Lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon cl$), onde: $A \rightarrow$ Absorbância; ϵ

→ absorvidade molar do soluto analisado; c → concentração do soluto em mol/L e l → caminho óptico percorrido pela luz (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Utilizando o princípio da espectrofotometria, foram realizadas as análises das soluções (**Figura 53**) de Floxina B, Fucsina Fenicada e Safranina no espectrofotômetro UV-VIS.



Figura 53 – Soluções de concentração (5×10^{-6} mol/L), onde foram retiradas as alíquotas que foram analisadas no espectrofotômetro: Floxina B, Fucsina Fenicada e Safranina, respectivamente.

Fonte: (Acervo do Projeto)

A análise espectrofotométrica do corante Safranina em meio aquoso apresentou o perfil espectral conforme disposto no **gráfico 1**, o qual permitiu estabelecer o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx.}}$) em 547nm.

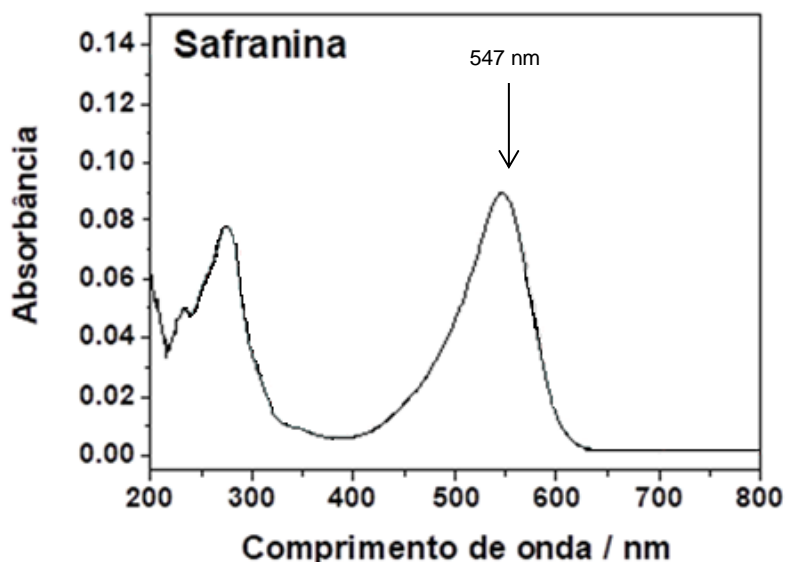


Gráfico 1 – Espectro de absorção UV-VIS do corante Safranina 5×10^{-6} mol/L em água de torneira.

A análise do **gráfico 1** mostra que o corante apresenta espectro definido com absorção máxima no comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) em 547 nm na região do visível, referente ao grupo cromóforo fenazina. De acordo com a literatura, a banda correspondente à absorção em torno de 547 nm pode ser atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo cromóforo fenazina, ou seja, perante a absorção da luz, a transição eletrônica ocorreu de um nível ocupado de maior energia (HOMO) para um não ocupado de menor energia (LUMO) (AARONT *et al.*, 1995; LAKOWICZ, 1999).

Com a Safranina tendo a absorção máxima ao redor do comprimento de onda citado, demonstra que o corante absorve na região correspondente ao verde, porém a cor aparente ao observador é a púrpura. Quanto mais fácil deslocar os elétrons π ou n , mais escura a cor e menos energia se precisa para a absorção. Assim, os sistemas com maior facilidade de absorver pelos processos $n \rightarrow \pi^*$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$ aparecem azuis, verdes ou até preta (ISENMANN, 2013).

Na análise do comportamento espectrofotométrico do corante Floxina B (**Gráfico 2**), o comprimento de onda onde há máxima absorção do corante Floxina B foi $\lambda_{\text{máx}} \approx 539$ nm, relativo ao grupo cromóforo xanteno. A banda de absorção correspondente a este comprimento de onda pode ser atribuída a uma

transição eletrônica do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo cromóforo dos xantenos, havendo uma transição de um nível π ocupado de maior energia para um nível π^* não ocupado de menor energia (DUARTE *et al.*, 2012; KUNAVIN, 1977). A Floxina B apresenta comprimento de onda em absorção máxima por volta de 539 nm, sendo assim, o grupo cromóforo absorve a luz na região da cor verde, porém a cor observada é púrpura (ISENMANN, 2013).

Devida à característica de fluorescência dos compostos de xanteno, também foi realizada a espectrofotometria de fluorescência da Floxina B. Na análise do comportamento espectrofotométrico, a molécula de Floxina B, quando recebeu a radiação luminosa, emitiu fluorescência em um comprimento de onda próximo de 555 nm (**Gráfico 3**).

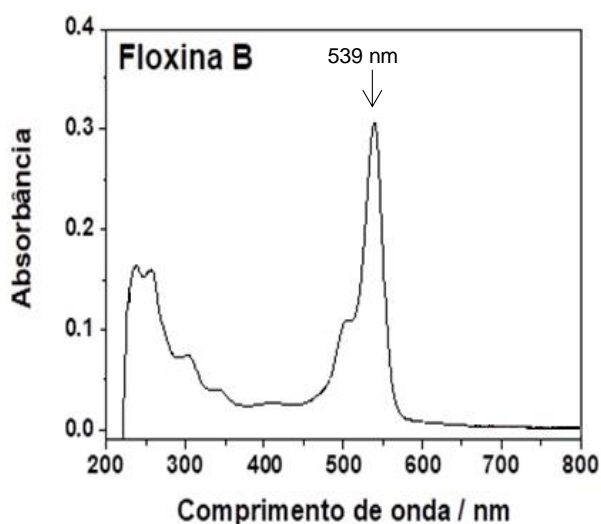


Gráfico 2 – Espectro de absorção UV-VIS do corante Floxina B (5×10^{-6} mol/L) em água de torneira.

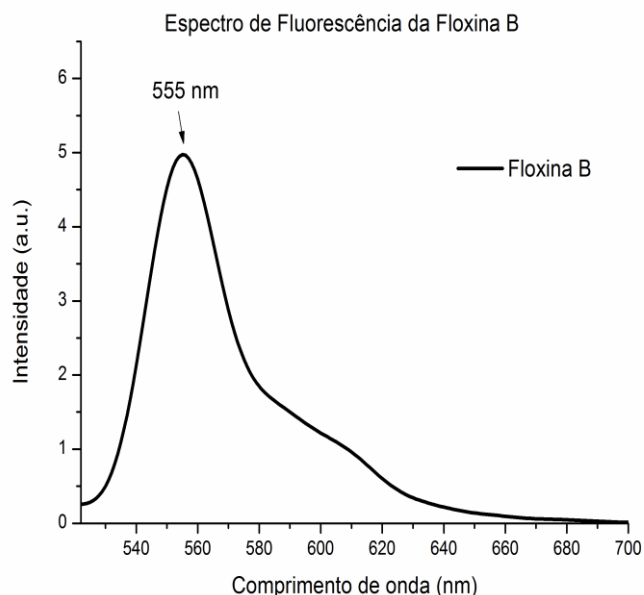


Gráfico 3 – Espectro de fluorescência da Floxina B (5×10^{-6} mol/L) em água de torneira.

Já o espectro de absorbância UV-VIS da Fucsina Fenicada pode ser visto no **gráfico 4**.

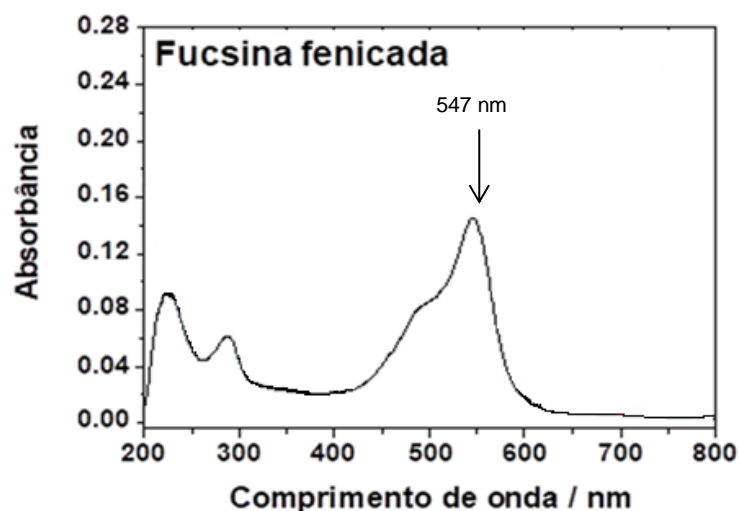


Gráfico 4 – Espectro de absorção UV-VIS do corante Fucsina Fenicada 5×10^{-6} mol/L em água de torneira.

Neste caso da Fucsina Fenicada, teve absorção de energia por parte do grupo cromóforo triarilmetano, pois é o único grupo desta molécula que apresenta características cromofóricas, qual apresentou absorção máxima no comprimento de onda por volta de 547 nm. Para o composto Fucsina Básica, a banda principal é composta de transições eletrônicas do tipo: denominada por HOMO \rightarrow LUMO, que está relacionada à transição eletrônica do sistema π do anel fenílico e o par solitário de átomos de nitrogênio, do sistema π^* do anel fenílico da estrutura do corante e de transições do tipo π^*_{C-N} (que são transições de $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$), enquanto existe um segundo tipo de transição eletrônica que é denominada por HOMO \rightarrow LUMO, devido à transição eletrônica de dois anéis fenílicos e o par solitário de nitrogênio e π^*_{C-N} (transição de $\pi-\pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$) (BENDJAEBUR, 2018).

O grupo cromóforo da Fucsina Fenicada absorve a luz também na região da cor verde, porém a cor observada é púrpura (ISENMANN, 2013).

Da solução de Tricrômico de Masson, não foi realizado o espectro de absorbância UV-VIS, pois ainda estamos estudando um protocolo para avaliar o seu comportamento de transição eletrônica e perante exposição à luz. Porém como esta solução é composta por três corantes, na literatura é encontrado que a Fucsina Ácida tem como $\lambda_{\text{máx}} \approx 540$ nm (STOWELL, 1943), sendo assim, ocorre

uma transição eletrônica nas mesmas regiões do que a Fucsina Básica por apresentarem o mesmo grupamento cromóforo. De acordo com Isenmann (2013), a absorção máxima de energia ocorre ao redor deste comprimento de onda, que é na região do verde, mas com a cor observada sendo púrpura.

Já no caso do corante Orange G, a molécula apresenta como grupo cromóforo a estrutura Azo e tem absorção com $\lambda_{\text{máx}} \approx 479$ (STOWELL, 1943; XU e LI, 2010). Na literatura é descrito que grupamento cromóforo Azo, tem como transição eletrônica do tipo $n_s \rightarrow \pi^*$ (ZOLLINGER, 1991).

Consoante Isenmann (2013), corantes que tem $\lambda_{\text{máx}}$ por volta de 479 nm, apresenta absorção na região que corresponde à cor verde azulado, entretanto, como cor observada tem-se o vermelho.

O último corante a ser comentado que compõe a solução do Tricrômico de Masson, é o Ponceau de Xilidina. Também apresenta grupamento Azo como cromóforo (CHUNG, 1983). Este corante tem absorção máxima no comprimento de onda por volta de 530 nm (FISCHER *et al.*, 1990). A banda na região do visível, responsável pela coloração do Ponceau de Xilidina, é atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$, referente ao grupo azo ($-N=N-$) (EL-DESOKY, 2010).

Por este corante ter $\lambda_{\text{máx}}$ por volta de 530 nm, apresenta absorção na região que corresponde à cor verde, tendo como a cor púrpura a observada (ISENMANN, 2013).

Todos os corantes aqui apresentados tiveram absorção máxima na região do visível no espectro.

6.4. DEGRADAÇÃO DOS CORANTES

Os gráficos 5 ao 8 mostram a projeção dos espectros das alíquotas que não foram expostas à luz, sobre os espectros das soluções que foram expostas a radiação luminosa. Primeiramente foram analisados os espectros de absorção UV-VIS e de Fluorescência da Floxina B (**Gráfico 5 e 6 respectivamente**).

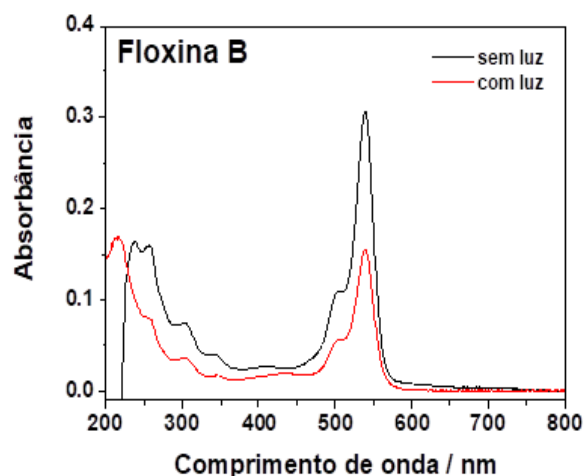


Gráfico 5 – Espectros de absorção UV-VIS da Floxina B de concentração 5×10^{-6} mol/L antes e depois da solução ser exposta à luz pelo período de 216 horas (9 dias).

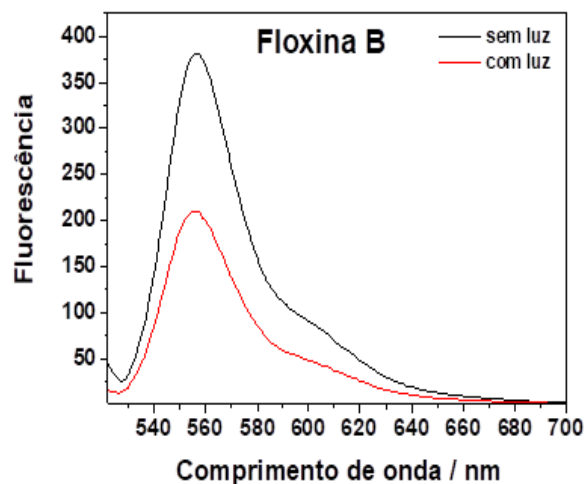


Gráfico 6 – Espectros de fluorescência da Floxina B de concentração 5×10^{-6} mol/L antes e depois da solução ser exposta à luz pelo período de 216 horas (9 dias).

Neste caso, com a quebra das ligações duplas do grupamento xanteno da molécula da Floxina B, ocorreu a diminuição da intensidade na absorção da luz e por isso houve essa diferença nos espectros das soluções (**Gráfico 5**). Devido à formação dos hidroperóxidos como citado por Gomes (2000), ocorreu a oxidação da molécula do corante e assim houve redução na absorção de energia quando a solução exposta à luz passou no aparelho para realizar a leitura. Por causa dessa diminuição da absorção de energia, devido à ruptura das ligações, a emissão de fluorescência desta solução também diminuiu (**Gráfico 6**).

Já no caso das soluções de Safranina e de Fucsina Fenicada, os espectros de ambas em exposição à luz, comparado com os que não foram expostos, são mostrados nos **gráficos 7 e 8**.

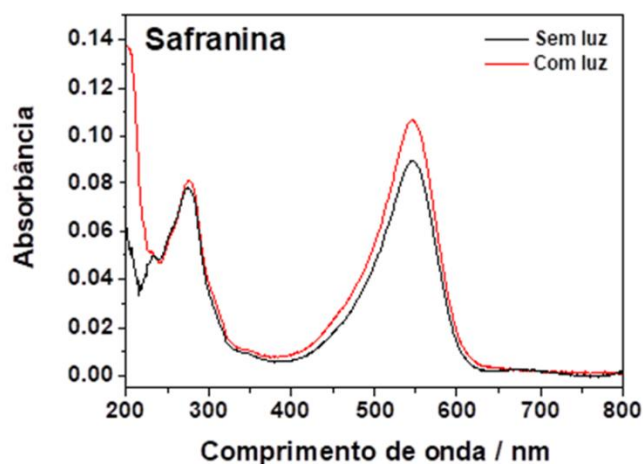


Gráfico 7 – Espectros de absorção UV-VIS da Safranina de concentração 5×10^{-6} mol/L antes e depois da solução ser exposta à luz pelo período de 216 horas (9 dias).

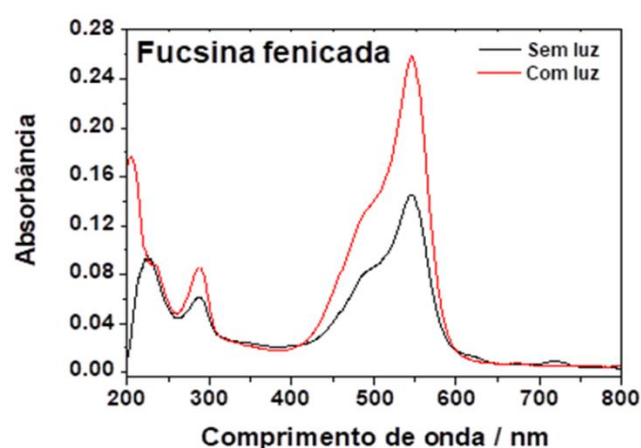


Gráfico 8 – Espectros de absorção UV-VIS da Fucsina Fenicada de concentração 5×10^{-6} mol/L antes e depois da solução ser exposta à luz pelo período de 216 horas (9 dias).

Em ambos os casos (Safranina e Fucsina Fenicada) as intensidades das absorções de energia luminosa ficaram maiores nas soluções que foram expostas à luz do que das soluções que não ficaram expostas, diferenciando-se do comportamento da Floxina B.

Consoante Gomes (2000), isso pode acontecer devido à agregação das moléculas dos corantes, pois quando a luz na qual a solução foi exposta entra em contato com este aglomerado, ocorre a separação dessas moléculas unidas, fazendo assim, com que, mais partículas de corantes sejam liberadas na solução, ocorrendo este aumento na intensidade de absorção de luz quando a solução foi passada no espectrofotômetro.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

A coloração, de forma sistêmica, de espécimes anatômicos destinados ao processo de plastinação é algo viável e, portanto, a utilização da Floxina B, Safranina, Fucsina Fenicada e do Tricrômico de Masson para esta finalidade, permitiu uma diferenciação satisfatória dos tecidos musculares de outras estruturas.

Dentre os corantes utilizados, concluiu-se que aqueles de caráter ácido (corantes aniônicos), produziram melhores resultados por não sofrerem o fenômeno de metacromasia, permanecendo assim com sua coloração original na peça e sendo o Tricrômico de Masson como o corante que mais se aproximou da coloração natural do músculo, representando, do ponto de vista da cor final, o melhor resultado.

Em relação à fotodegradação dos corantes que foram expostos a luz, a solução que mais apresentou diminuição na intensidade de absorção da energia foi a Floxina B, porém estudos complementares serão necessários e extremamente importantes para avaliar a durabilidade e resistência dos corantes após a finalização do processo de plastinação.

Perspectivas da Pesquisa

8. PERSPECTIVAS DA PESQUISA

Dada a relevância dos resultados deste estudo para a área da Plastinação e do Ensino de anatomia, nosso grupo de pesquisa pretende continuar com estudos em relação à resistência dos corantes, além de analisar a cinética de decaimento em função, da fotodegradação dos corantes utilizados, além também de investigar mecanismos para diminuir a oxidação dos corantes para poder ter uma maior durabilidade do espécime plastinado.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON, J. J.; MAAFI, M.; PÁRKÁNYI, C.; BONIFACE, C. Quantitative treatment of the solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra of acridines and phenazines. The ground and first excited singlet-state dipole moments. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 51, n. 4, p. 603–615, 1995.

ABREU, J. L. N. Os estudos anatômicos e cirúrgicos na medicina portuguesa do século XVIII. **Revista Da SBHC**, v. 5, n. 2, p. 149–158, 2007.

ADEGOKE, O. A.; GHOSH, M.; MUKHERJEE, A. Spectrophotometric and thermodynamic studies of the interactions of 4-carboxyl-2,6-dinitrophenylazohydroxynaphthalenes with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 96, p. 1038–1046, 2012.

AJITA, R.; SINGH, Y. I. Body Donation and Its Relevance in Anatomy Learning – A Review . **J. Anat. Soc. India**, v. 56, n. 1, p. 44–47, 2007.

AKERMAN, K. E. O.; WIKSTRÖM, M. K. F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Letters**, v. 68, n. 2, p. 191–197, 1976.

ALVES, C.A., ACIOLE, S.D.G. Formaldeído em escolas: uma revisão. **Revista Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2025-2039, 2012.

AN, X.; YUE, B; LEE, J. H.; LIN, C.; HAN, S. H. Arterial anatomy of the gracilis muscle as determined by latex injection and glycerin transparency. **Clin. Anat.**, v. 25, p. 231-234, 2012.

ANDREOLI, A.T.; SILVA, H. F.; SEREN, H.; SILVA, G. P. O. Aprimoramento de técnicas de conservação de peças anatômicas: a técnica inovadora de plastinação. **Revista EPeQ/Fafibe on-line**, v.1, p. 81-85, 2012.

ARAUJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria/Prática**. 3º Ed.Rev. ampl. – Viçosa: UFV. 478p, 2014.

BALTA, J. Y.; CRONIN, M.; CRYAN, J. F.; O'MAHONY, S. M. Human preservation techniques in anatomy: A 21st century medical education perspective. **Clinical Anatomy**, v. 28, n. 6, p. 725–734, 2015.

BEDINO, J. H. Embalming chemistry: glutaraldehyde versus formaldehyde. **Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices**, n. 649, p. 2614–2632, 2003.

BENDJABEUR, S.; ZOUAGHI, R.; ZOUCOUONE, B.; SEHILI, T. DFT and TD-DFT insights, photolysis and photocatalysis investigation of three dyes with similar structure under UV irradiation with and without TiO₂ as a catalyst: Effect of adsorption, pH and light intensity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 190, p. 494–505, 2018.

BONANCÊA, C. E. Estudo espectroscópico de processos de degradação fotoquímica e fotoeletroquímica de corantes. 2010. 154 f. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Físico-Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BUCK, S. T. G. Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica. 2009. 93 f. **Dissertação de Mestrado** (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CAO, Y.; HE, X. Studies of interaction between safranin T and double helix DNA by spectral methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 54, n. 6, p. 883–892, 1998.

CARR, D. H.; WALKER, J. E. Carbol fuchsin as a stain for human chromosomes. **Stain Technology**, v. 36, n. 4, p. 233–236, 1961.

CHANG, R. **Química**. 5ª edição, Lisboa: Mc Graw- Hill, 1994

CHUNG, K.-T. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 114, n. 3, p. 269–281, 1983.

COHN, M.; TOWNSEND, J. A study of manganous complexes by paramagnetic resonance absorption. **Nature**, v. 173, n. 4414, p. 1090–1091, 1954.

CHRISTIE, R. M. **Colour chemistry**. 2nd edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015. 372 p.

DAPSON, R. Dye–tissue interactions: mechanisms, quantification and bonding parameters for dyes used in biological staining. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 80, n. 2, p. 49–72, 2005.

DARÉ-DOYEN, S.; DOIZI, D.; GUIBAUD, Ph.; DJEDAÏNI-PILARD, F.; PERLY, B.; MILLIÉ, Ph. Dimerization of xanthene dyes in water: Experimental studies and molecular dynamic simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 50, p. 13803–13812, 2003.

DE SOUZA, D. R.; MIRANDA, J. A.; RIBEIRO, K. R.; MAPELI, A. M.; SANTOS, D. J. Degradação fotocatalítica de corante alimentício azorrubina e monitoramento de redução de toxicidade. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 50–56, 2016.

DUARTE, P., FERRERA, D. P., MACHADO, I. F.; FERREIRA, L. F. V.; RODRÍGUEZ, H. B.; ROMÁN, E. S. Phloxine B as a probe for entrapment in microcrystalline cellulose. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1602–1616, 2012.

EL-DESOKY, H. S.; GHONEIM, M. M.; ZIDAN, N. M. Decolorization and degradation of Ponceau S azo-dye in aqueous solutions by the electrochemical advanced Fenton oxidation. **Desalination**, v. 264, n. 1, p. 143–150, 2010.

FERREIRA, J. A. B.; COSTA, S. M. B. Rhodamine 3B⁺ ClO₄[−] electronic transitions: reaction field and vibrational structure. **Chemical Physics**, v. 273, n.1, p. 39–49, 2001.

FERRO, A. B., ALVES, I., SILVA, M. A., CARRUJO, O. Optimização da técnica do tricrómio de masson. **Revista Técnica de Anatomia Patológica**, n. 13, p. 34 -39, 2006.

FISCHER, C. H.; RABE, J. G.; BISCHOF, M. Identification of natural and early synthetic textile dyes with HPLC and UV/Vis-Spectroscopy by diode array detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, n. 2, p. 319–331, 1990.

FLEMING, G. R. et al. Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 13, p. 4306–4311, 1977.

FOOT, N. C. The masson trichrome staining methods in routine laboratory use. **Stain Technology**, v. 8, n. 3, p. 101–110, 1933.

FORNAZIERO, C.G., GIL, C.R.R. Novas tecnologias aplicadas ao ensino da anatomia humana. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 27, n.2, p. 141-146 , 2003.

FOX, C. H.; JOHNSON, J. B.; WHITING, J.; ROLLER, P. P. Formaldehyde fixation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 33, n. 8, p. 845–853, 1985.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A brief review of structure and function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183–195, 2015.

GALINDO, C.; JACQUES, P.; KALT, A. Photochemical and photocatalytic degradation of an indigoid dye: a case study of acid blue 74 (AB74). **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 47–56, 2001.

GAMARRA, F. M. C. Extração de corantes naturais e óleos essenciais. 2006. 76 f. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GÖKTÜRK, S.; TUNÇAY, M. Spectral studies of safranin-O in different surfactant solutions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 8, p. 1857–1866, 2003.

GOLDNER, J. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. **Am. J. Pathol**, v.14, n. 2, p. 237-43, 1938.

GÓMEZ, C. A. M.; ORTIZ, J. A. Plastinación: un instrumento complementario para el desarrollo del proceso enseñanza-aprendizaje de la anatomía. **Rev. Med. Vet**, v. 23, p. 111-117, 2012.

GOMES, J. I. N. R. **Química da cor e dos corantes**. 2000. Disponível em: <<http://www.geocities.ws/jnrgomes/livrocorantes.pdf>> - Acesso em 28 de Março de 2018.

GREER, C.E; LUND J.K; MANOS, M.M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. **PCR Methods Appl**, v. 1, p. 46-50, 1991.

GRONDIN, G. Plastination: a modern approach to chiropractic teaching. **J Can Chiropr Assoc**, v. 42, n. 2, p. 107-112, 1998.

GUINOT, S. G. R.; HEPWORTH, J. D.; WAINWRIGHT, M. The effects of cyclic terminal groups in di- and tri-arylmethane dyes. Part 2.1 Steric and electronic effects in derivatives of Victoria Blue. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 2, p. 297–303, 1998.

HADER, R.N., WALLACE, R.D., McKINNEY, R.W. Formaldehyde from methanol. **Journal of Industrial Engineering Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1508-1518, 1952.

HAJIBABAEI, M.; DEWAARD, J. R.; IVANOVA, N. V.; RATNASINGHAM, S.; DOOH, R. T.; KIRK, S. L.; Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1959–1967, 2005.

HAMAZAKI, S; KOSHIBA, M; HABUCHI T; TAKAHASHI, R; SUGIYAMA, T. The effect of formalin fixation on restriction endonuclease digestion of DNA and PCR amplification. **Pathology Research and Practice**, v. 189, n. 5, p. 553-557, 1993.

HENRY, R.W.; LATORRE, R. M.; GARCÍA-SANZ, M. P.; MORENO, M.; HERNÁNDEZ, F.; GIL, F.; LÓPEZ, O.; AYALA, M. D.; RAMÍREZ, G.; VÁZQUEZ,

J.M.; ARENCIBIA, A. How useful Is plastination in learning anatomy? **Research and Education Reports**, v. 34, n. 2, p.172-176, 2007.

HOROBIN, R. How romanowsky stains work and why they remain valuable — including a proposed universal romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 1, p. 36–51, 2011.

HOROBIN, R.; FLEMMING, L. Structure-staining relationships in histochemistry and biological staining. **Journal of Microscopy**, v. 119, n. 3, p. 357–372, 1980.

HOROBIN, R. W. Biological staining: Mechanisms and theory. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 77, n. 1, p. 3–13, 2002.

HUXLEY, H.; HANSON, J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. **Nature**, v. 173, n. 4412, p. 973-976, 1954.

IQBAL, M. **Textile dyes**. Pakistan: Rehbar publishers Karachi, p. 179, 2008.

ISENMANN, A. F. **Corantes**. 1ª Edição. Timóteo, MG, p. 345, 2013.

JONES, D. G.; WHITAKER, M.I. Engaging with plastination and the body worlds phenomenon: A cultural and intellectual challenge for anatomists. **Clin Anat**, v. 22, p. 770– 776, 2009

JONES, D. G. Re-inventing anatomy: The impact of plastination on how we see the human body. **Clin Anat**, v. 15, p. 436–440, 2002.

KANG,J.; LLIFF, S.; HENRY, R.W.; HERMEY, D. Coloring muscles and vessels of plastinated limbs with colored silicone to Supplement Teaching. **Journal of Plastination**, v. 27, n. 2, p. 9-12, 2015.

KIM, J. H., Exposição de Corpos Humanos: O uso de cadáveres como entretenimento e mercadoria, **MANA**, v. 18, n. 2, p. 309-348, 2012.

KNOTT, J. Popular attitudes to death and dissection in early nineteenth century

britain: The anatomy act and the poor. **Labour History**, v. 49, n. 49, p. 1-18, 1985.

KUNAVIN, N. I.; NURMUKHAMETOV, R. N.; KHACHATUROVA, G. T. Phosphorescence and orbital nature of triplet state of xanthene dyes. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 26, n. 6, p. 735–739, 1977.

LADEIRA, C.A.F. *Biomarcadores genotóxicos e polimorfismos genéticos em trabalhadores expostos a formaldeído*. 2009. 50f. **Dissertação de Mestrado** (Mestrado em Biologia Molecular Humana) - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal, 2009.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 2006.

LEEK, F. F. The problem of brain removal during embalming by the ancient egyptians. **The Journal of Egyptian Archaeology**, v. 55, p. 112, 1969.

LING, Y. et al. Multidimensional optical sensing platform for detection of heparin and reversible molecular logic gate operation based on the phloxine B/polyethyleneimine system. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 1575–1581, 2015.

LOFRUMENTO, C. et al. Safranin-O dye in the ground state. A study by density functional theory, Raman, SERS and infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 677–684, 2015.

LYE, J. Colour chemistry. **Color Research & Application**, v. 27, n. 5, p. 376–377, 2002.

MAGDE, D.; ROJAS, G. E.; SEYBOLD, P. G. Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 5, p. 737–744, 1999.

MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. Chemistry and colors. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1508–1534, 2015.

MATSUHARA, M. L.; MACHADO, L. R. G.; FERNANDES, L. C. Espectrofotometria de lentes oftálmicas orgânicas de visão simples submetidas à radiação ultravioleta A, ultravioleta B e luz visível. **Arq Bras Oftalmol**, v. 67, p.571-574, 2004.

McCREARY, J.; LLIFF, S.; McCREARY, K.; HENRY, R. W. Silicone-Based Coloration Technique Developed to Highlight Plastinated Specimens. **The Journal of Plastination**, v. 25, n.2, p. 13-20, 2013.

MORAN, C. Reducing the toxicity of textile effluent. **Journal of the Society of Dyers and Colourists**, v. 114, n. 4, p. 117–118, 2008.

MURUGANANDHAM, M. Photochemical oxidation of reactive azo dye with UV–H₂O₂ process. **Dyes and Pigments**, v. 62, n. 3, p. 269–275, 2004.

MUSIAL, A. et ; GRYGLEWSKIAL, R. W.; KIELCZEWSKI, S.; LOUKAS, M.; WAJDA, J. Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries. **Folia medica Cracoviensia**, v. 56, n. 3, p. 31–40, 2016.

NIGEL CORNS, S.; PARTINGTON, S. M.; TOWNS, A. D. Industrial organic photochromic dyes. **Coloration Technology**, v. 125, n. 5, p. 249–261, 2009.

OLIVEIRA, C. S. DE. *Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores cristais violeta e azul de metileno em sistemas microheterogêneos e em células cancerosas em cultura*. 2006. 124 f. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Bioquímica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, S.V.W.B., ZAIAT, M. Gerenciamento de solução de formol em laboratórios de anatomia. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 1, p. 18-25, 2005.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination — A review. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 20, p. 4141–4166, 2011.

ORGANIZATION, H. W. *Formaldehy, 2 butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-*

ol. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 88, p. 483, Lyon - France, 2006

PASTOUREAU, P. C.; HUNZIKER, E. B.; PELLETIER, J.-P. Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 2, p. S106–S112, 2010.

PAULA, E. S. DE. As origens da medicina: a medicina no antigo Egito. **Revista de História**, v. 25, n. 51, p. 13–48, 1962.

PAULA, R. C. DE. *Análise morfológica da propriedade de compostos vegetais na conservação de tecidos cadavéricos*. 2014. 67 f. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.

PESSIS, A. M. Do estudo das gravuras pré-históricas no nordeste do Brasil. **Revista Clio Arqueológica**, v.1, n. 15, p. 29-44, 2002.

PRENTO, P. A contribution to the theory of biological staining based on the principles for structural organization of biological macromolecules. **Biotechnic and Histochemistry**, v.. 76, n. 3, p. 137–161, 2001.

PRENTO, P. Staining of macromolecules: possible mechanisms and examples. **Biotechnic & Histochemistry**, v.84, n.4, p. 139-158, 2009.

QUEIROZ, C. A. F. *O uso de cadáveres humanos como instrumento na construção de conhecimento a partir de uma visão bioética*. 2005. 116 f. **Dissertação de Mestrado** (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia - Goiás, 2005.

RAOOF, A.; MARCHESE, C.; MARCHESE, L. A; FALK, K.C.; MIRAFZALI, N. Painting plastinated neurovascular pathways: Evaluation of coloring techniques. **The Journal of Plastination**, v.25, n.2, p. 21-26, 2013.

RASOOLY, A.; WEISZ, A. In vitro antibacterial activities of phloxine B and other halogenated fluoresceins against methicillin-resistant staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3650–3653, 2002.

RASOOLY, R. Phloxine B, a versatile bacterial stain. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 261–265, 2007.

RIBEIRO, F. W. P. et al. Eletrodegradação de ponceau 2R utilizando ânodos dimensionalmente estáveis e Ti/Pt. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 85–90, 2013.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004

ROBERTO, R.; JUAN, H. Anatomia humana: Ciência, ética, desenvolvimento e educação. **Revista Med**, v. 20, n. 2, p. 11–13, 2012.

RODRIGUES, H. **Técnicas anatômicas**. 3. ed. Vitória: Edson Arte, 2005.

SAMPAIO, F.J.B. Analysis of kidney volume growth during the fetal period in humans. **Urological Research**, v. 20, p.271-274,1992.

SANTOS DE LIMA, A.; DE, M.; SIKORA, S. Degradação De Corantes Modelo Por Fotólise Colours of Decay Model By Photolysis. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 11, n. 8, p. 110–119, 2015.

SANTOS, I.T.P.Q. *Avaliação da atividade clastogênica do resíduo catalítico industrial, por meio do bioensaio de micronúcleos com Tradescantia pallida cv Purpurea*. 2004. 114f. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SARON, C.; FELISBERTI, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124–128, 2006.

SARTORI, P.H.S; LORETO, E.L. Medidor de Fluorescência Caseiro. **Química Nova na Escola**, v.31, n.2, p. 150-154, 2009.

SCHABBACH, L. M. *Utilização da Espectrofotometria na Caracterização e Predição de Cores de Esmaltes Cerâmicos Monocromáticos Opacos*. 2004. 200 f. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.

SILVA, R.M.G., MATERA, J.M., RIBEIRO, A.A.C.M. Avaliação do método de ensino da técnica cirúrgica utilizando cadáveres quimicamente preservados. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 6, n. 1, p. 95-102, 2003.

SILVA, R.M.G.; MATERA, J.M.; RIBEIRO, A.A.C.M. Preservation of cadavers for surgical technique training. **Veterinary Surgery**, v. 33, p. 606-608, 2004.

SILVA, R.M.G.; MATERA, J.M.; RIBEIRO, A.A.C.M. New alternative methods to teach surgical techniques for veterinary medicine students despite the absence of Living Animals. Is that a Academic Paradox? **Anatomy, Histology and Embryology**, v.36, p. 220-224, 2007.

SIQUEIRA, L. F. DE G.; ALMEIDA, R. G. DE; BELDA, W. Comportamento tintorial do mycobacterium leprae: revisão histórica. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, n. 4, p. 297–315, 1983.

SIQUEIRA, L. F. DE G.; ALMEIDA, R. G. DE; BELDA, W. Métodos tintoriais utilizados na identificação do Mycobacterium leprae: revisão histológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 246–258, 1984.

SHORE, J. **Colorants and auxiliaries: organic chemistry and application properties**. 2.ed. Manchester: Society of Dyers and Colourists, v.1 - colorants, 2002.

SLADEWSKI, T. E.; SHAFER, A. M.; HOAG, C. M. The effect of ionic strength on the UV–vis spectrum of congo red in aqueous solution. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 65, n. 3–4, p. 985–987, 2006.

SOUZA, S.C. Anatomia: aspectos históricos e evolução. **Revista de Ciências**

Médicas e Biológicas (Journal of Medical and Biological Sciences), v.10, n.1, p. 3-6, 2011.

STOWELL, R.E. A spectrophotometric analysis of tissue staining. **Stain Technology**, v.18, n.2, p. 57-71, 1943.

STUART, M.D. and HENRY, R.W. Plastinated specimens can improve the conceptual quality of biology labs. **Am Biol Teach**, v. 64, n. 2, p. 130-134, 2002.

SURIYAPRAPADILOK L, WITHYACHUMNARNKUL B. Plastination of stained sections of the human brain: comparison between different staining methods. **The Journal of Plastination**, v. 12, n. 1, p. 27-32, 1997.

TALAMONI, A.C.B. **Os nervos e os ossos do ofício: uma análise etnológica da aula de Anatomia [online]**. 1. ed. São Paulo: UNESP, 2014, v.1, p.163.

TAVANO, P. T; DE OLIVEIRA, M. C. Surgimento e desenvolvimento da ciência anatômica. **Anuário da Produção Acadêmica Docente**, v. 2, n. 3, p. 73-84, 2009.

TCHAPLA, A. et al. Characterisation of embalming materials of a mummy of the ptolemaic era. Comparison with balms from mummies of different eras. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 3, p. 217–234, 2004.

TIMM, L. L. Técnicas rotineiras de prevenção e análise de lâminas histológicas. **Métodos de Estudo em Biologia**, v.2, n. 1, p. 231 - 239, 2005.

TOKUDA, Y. et al. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. **Journal of clinical pathology**, v. 43, n. 9, p. 748–751, 1990.

TOLOSA, E. M. C. et al. **Manual de Técnicas Para Histologia Normal e Patológica**. São Paulo: Manole, 2003.

VALLE, V. G. R. *Efeitos indesejáveis do uso de safranina como indicador de potencial elétrico de membrana mitocondrial*. 1986. 69 f. **Dissertação de Mestrado** (Mestrado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP),

1986.

VEUTHEY, T.; HERRERA, G.; DODERO, V. I. Dyes and stains: from molecular structure to histological application. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 19, p. 91-112, 2014.

VIEIRA, J. **Fundamentos da Colorimetria**. p. 19–58, 2011.

VON HAGENS G.; TIEDEMAN K.; KRIZ W. The current potential of plastination. **Anatomy and Embryology**, v. 175, p. 411-421, 1987.

WANG, H. et al. Visible light induced photodegradation and phototoxicity of phloxine B and uranine. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, n. 5, p. 438–441, 2008.

WOLFE, R. R. The underappreciated role of muscle in health and disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 3, p. 475–482, 2006.

WU, Y. et al. Photodegradation of Some Dyes Over Ce/FSM-16 Catalyst Under Solar Light. **Catalysis Letters**, v. 119, n. 3–4, p. 245–251, 2007.

XU, X.-R.; LI, X.-Z. Degradation of azo dye Orange G in aqueous solutions by persulfate with ferrous ion. **Separation and Purification Technology**, v. 72, n. 1, p. 105–111, 2010.

YANG, K. et al. Inkjet printing of palladium source and drain electrodes on individual single-wall carbon nanotubes to fabricate field effect transistors. **RSC Advances**, v. 3, n. 45, p. 236- 258, 2013.

ZOLLINGER, H. **Color chemistry**: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. 2nd ed. New York: V.C.H. Publishers, 1991.

